

Ref. 7

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 平2-291271

⑨ Int. Cl.
 C 12 N 15/31
 A 61 K 39/00

識別記号 廃内整理番号
 ZNA J 8829-4C

⑬ 公開 平成2年(1990)12月3日

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全43頁)

④ 発明の名称 発現伝播体を有する組成物

⑤ 特願 平1-165503

⑥ 出願 平1(1989)6月29日

⑦ 優先権主張 ⑧ 1988年6月29日米国(US)⑨ 213,248

⑩ 発明者 ダリル ファウルズ アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ミルブレー, ヒルクレスト ブールバード 1345番地

⑪ 発明者 ウィリアム エヴァン アンドリュース アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サンマテオ, フラソム ドライブ 708番地

⑫ 出願人 エム エル テクノロジー ベンチャーズ, エルビー アメリカ合衆国, ニューヨーク州 10281, ニューヨーク, ワールド ファイナンシャル センターノース タワー 18階 番地なし

⑬ 代理人 弁理士 丹羽 宏之
最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

発現伝播体を有する組成物

2. 特許請求の範囲

(1) 1種の発現伝播体より成る組成物であつて、この発現伝播体が、少なくとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号付与を行う1種のDNA配列により成ると共に、前記タンパク質が、肺炎病原体抗原のエピトープを認識する抗体を誘導する機能を備えることを特徴とする発現伝播体を有する組成物。

(2) 発現伝播体が、少くとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号付与を行う1種のDNA配列により成ると共に、前記タンパク質が、肺炎病原体の74.5kDa抗原、肺炎病原体の41kDa抗原、肺炎病原体の36kDa抗原、肺炎病原体の96kDa抗原、および肺炎病原体の41kDa抗原のうちのいずれか1種の抗原のエピトープを認識する抗体を誘導する機能を備えるこ

とを特徴とする請求項1記載の発現伝播体を有する組成物。

(3) 発現伝播体が、少なくとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号付与を行う1種のDNA配列により成ると共に、前記タンパク質が、肺炎病原体の74.5kDa抗原のエピトープを認識する抗体を誘導する機能を備えることを特徴とする請求項1または2記載の発現伝播体を有する組成物。

(4) 発現伝播体が、肺炎病原体74.5kDa抗原に対するDNA配列の少なくとも一部分を含すると共に、このDNA配列が、アミノ酸配列を有する前記74.5kDa抗原の少なくとも一部分のアミノ酸残基をV_a1'からC_y5'に変化させ、アミノ酸残基をV_a1'からA_r8'に変化させる突然変異を含むことを特徴とする請求項1から3までのいずれかに記載の発現伝播体を有する組成物。

(5) 発現伝播体が、肺炎病原体の74.5kDa抗原に対するDNA配列の少なくとも一部分を

特開平2-291271(2)

包含すると共に、このDNA配列が突然変異を含み、アミノ酸残基T-G-P³³¹に対するコドンTGAが、アミノ酸配列を有する前記74、SKDロの少くとも一部において、TGDコドンに置換され、このTGGコドンもアミノ酸残基T-G-P³³¹に対する遺伝暗号であることを特徴とする請求項1から3までのいずれかに記載の発現伝播体を有する組成物。

(6) 発現伝播体が、肺炎球菌に対するDNA配列の少くとも一部分を包含すると共に、その発現伝播体が、トリプトファンT¹⁷⁶遺伝子に遺伝暗号付与する少なくともさうに1組のDNA配列を有することと特徴とする請求項1から3までのいずれかに記載の発現伝播体を有する組成物。

(7) DNA配列内において、そのCys¹⁷⁷がVal¹⁷⁷によって置換され、Ala¹⁷⁷がVal¹⁷⁷によって置換されることを特徴とする請求項1から3までのいずれかに記載の発現伝播体を有する組成物。

アラズマ用の組成物形抗原に関する。さらに詳しくは、この発明は、マイコプラズマ性肺炎、特に豚のマイコプラズマ性肺炎を予防するためのワクチンに関する。

(従来の技術)

肺炎マイコプラズマに起因する疾患は、世界中に発生しており、特にそれが豚の体内に発生する場合は、豚の繁殖の損失と深く係り合うことになる。一旦この病気にかかった動物は、活力低下、発育不良および病死となってしまうのみならず、日和見微生物による二次感染を受ける傾向が少なくない。

豚のマイコプラズマ性肺炎を予防するためのワクチンを開発する試みは、豊多く行われて来たわが、これらのワクチンは何れも不成功に終わっている状況である。

例えば、米国獣医学研究会報(Am.J.Vet.Res.)第42号(1981)の第784頁に掲載されたとおり、クリステンセンおよびその共同者は、肺炎マイコプラズマの細胞を熱によって非活性化

(8) 発現伝播体が、少なくとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号付与を行う1種のDNA配列より成ると共に、前記タンパク質が、肺炎球菌36×Kローマ抗原のエピトープを認識する抗体を誘導する機能を備えることを特徴とする請求項1または2記載の発現伝播体を行する組成物。

(9) 肺炎球菌抗原のエピトープを認識する抗体が、生物の体内において誘導されることを特徴とする請求項1記載の発現伝播体を行する組成物。

(10) 前記タンパク質が、生成体によって発現されることを特徴とする請求項1記載の発現伝播体を行する組成物。

(11) 肺炎球菌抗原が、予防接種剤の成分として使用されることを特徴とする請求項1記載の発現伝播体を行する組成物。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、発現伝播体を有する組成物、例えば、肺炎球菌の抗原等に関し、特に肺炎マイコ

し、これを豚に注射したが、マイコプラズマ性肺炎に対する予防効果がなかったことを認めている。

またエセリッジ(Etheridge)およびその共同者による、獣医学研究報(Res.Vet.Sci.)第33号(1982)の第188頁の記載によれば、生ワクチンが肺内、皮下、あるいは腹腔内に注入された場合に、肺炎球菌マイコプラズマによる定着を完全に防止することは不可能であることが認められている。

さらにロス(Noss)およびその共同者は、米国獣医学研究会報(Am.J.Vet.Res.)第44号(1984)の第1899頁において、強熱法によって調製された肺炎マイコプラズマの抽出物は、その予防作用が必ずしも一定しておらず、時によると、むしろ病歴を拡大させることがあると述べている。さらに、ロス氏等の説明等によると、そのようなワクチンを豚に注射した場合、菌株VP-11を含有する病歴の肺臓の10%懸濁液から採取した上澄液の4倍と、同一の菌株の1.5

特開平2-291271 (3)

乃至20分割を24時間培養したのもの1mLとを組合せて成る気管内抗原投与に対しては、或る程度の予防効果を与えたと提唱されている。

(発明が解決しようとする課題)

前記のとおり、従来の肺炎病原体ワクチンでは、なお多くの欠点があったので、この発明は、これらの欠点を軽減して、免疫性の高い細胞を行うための抗原をまず粗成物を得ることを目的とする。

(課題を解決するための手段)

この発明の1つの手段としては、少なくとも1種の肺炎マイコプラズマ抗原のエピトープを認識する抗体を誘導する機能を有する少なくとも1種のタンパク質に暗号付与するDNA(デオキシリボ核酸)配列を含むところの、粗成形DNA分子、あるいは発現伝播体またはクローン化、伝播体(ベクターまたはプラスミド)を提供する。

また、この発明は、少なくとも1種のタンパク質を発現する機能を有するような発現伝播体に

肺炎病原体抗原のエピトープを認識する1つの抗体を誘導する機能を有すると仮定すれば、このDNA配列は、全体として同一の抗原であるタンパク質に対して暗号付与ができるのみならず、その抗原の断片または誘導体のタンパク質、あるいは抗原または断片と、他のタンパク質との融合生産物であっても、それに対して遺伝暗号付与ができるのである。従って例えば、分子量74.5kDa(キロダルトン)の抗原の断片が74.5kDaの抗原のエピトープ(抗原の構造を決定する決定基、1個または複数個)を認識する抗体を誘導する機能を有するらば、前記DNA配列は、この74.5kDaの抗原の断片である1種のタンパク質(即ち、43kDa(キロダルトン)の分子量を有し、かつ74.5kDaの抗原ペプチド配列の部分を有するタンパク質)に対して遺伝暗号付与ができるのである。

同様に、抗原の誘導体が、例えば、ペプチド組内の1個または2個以上のアミノ酸の突然変異体であって、その誘導体が、上記の肺炎病原体の抗

よって形質転換されるところの宿主を提供する。

さらに、前記宿主によって発現される少なくとも1種のタンパク質を含むするワクチンを提供する。

要するに、前記のDNA配列は、少なくとも1種の肺炎マイコプラズマ抗原のエピトープを認識する1種の抗体を誘導する機能を有するところの、少なくとも1種のタンパク質に対して遺伝暗号化するものである。好ましくは、この肺炎マイコプラズマ抗原は、改変の肺炎マイコプラズマ抗原、即ち、74.5、36.41、9.8、74.8の突然変異体、但し74.5の74.16突然変異体には麻痺されない、および、前記抗原を暗号化するDNA配列の少なくとも1つのコードンが突然変異化されたところの74.5突然変異体、および分子量41.7キロダルトン(以下40.0とする)の肺炎マイコプラズマ病原体抗原である。

このDNA配列から生成されるタンパク質が、

原のエピトープを認識する抗体を誘導させる機能を有する限りにおいては、そのような誘導体であるタンパク質に対して、上記のDNA配列が暗号付与を行なうことができる。

つぎに、(i) 前記の肺炎病原体抗原のエピトープを認識する抗体を誘導させる機能を有する1種のタンパク質と、(ii) それ以外の1種のタンパク質との融合生産物のタンパク質に対しても、前記DNA配列が暗号付与を行なうことができる。

要するに、「特に肺炎病原体用と指定された抗原のエピトープを認識するところの抗体を誘導させる機能を有するところの、1種のタンパク質に対する遺伝暗号を作成するDNAの配列」という用語の意味は、DNAの種々の配列が、形質転換された細胞内において、種々のタンパク質に対する遺伝暗号を付与し、選択すれば発現することを意味し、そのタンパク質は適切な抗原であることは勿論、その断片または誘導体であってもよく、あるいは、この抗原とその断片または誘導体と、そ

特開平2-291271 (4)

の他のタンパク質との融合生成物であってもよいということである。

また、1つの細胞内にベクターが導入された場合、そのベクター内に存在するDNA配列は、その配列によって暗号化されているタンパク質の一部分のみを表現することができるものであるが、そのようなDNA配列もまた、発現されたタンパク質の一部が、筋萎縮性側索硬化症の1種または2種以上の抗原のエピトープを認識する抗体を誘発することができるならば、そのDNA配列も前記の用語の範囲に含まれるものとする。

例えば、このDNA配列は、すべての抗原に対して暗号を付与することができるが、発現されるタンパク質は、その抗原の断片である。また、クローニングされた伝播体が、2種以上の筋萎縮性側索硬化症抗原または断片に対して暗号化するDNAを含み得ることも可能である。

適切なDNA配列であれば、広く種々のベクターあるいはプラスマドの何れにも含まれるとができる。このようなベクターは、染色体および

および、原核細胞および真核細胞またはそれらのフィルス内の遺伝子の発現を制御するために知られている他のプロモータである。発現ベクターは、翻訳開始と転写終了のためのリボソーム結合位置をも含む。さらにベクターは、発現を増幅するための適切な配列を含むことができる。

さらに、好みしくは発現ベクターは、真核細胞培養用のジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン耐性の如き、あるいは、大腸菌内のテトラサイクリンまたはアンビシリン耐性の如き、形質転換された宿主細胞を選択するための表現形質を与える遺伝子を含むことが望ましい。

前述のとおり適切なDNA配列ならびに適切なプロモータあるいは制御配列を含むベクターを使用すれば、或る適切な宿主の形質を転換させ、その宿主がタンパク質を発現するようにさせることができる。適切な宿主の代表的な実験を列挙すれば、大腸菌、ねずみチフス菌等の細菌細胞、酵母菌等のカビ細胞； CHOまたはバクス (BHK) の黒色細胞等の動物細胞； および植物細胞、そ

非染色体の、および合成のDNA配列を含み、例えば、SV40の潜伏体、細菌プラスマド、ファージDNA、酵母菌プラスマド、あるいは、プラスマドと、ファージDNA、ウィルスのDNA（例えば牛痘、アデノウィルス、麻疹、ウィルス、伝染性火病など）との組合せから求められたベクター、などである。

この適切なDNA配列は、種々の方法でベクター中に挿入することができる。一般に、このDNA配列は、従来周知の方法により、適切な制限酵素の位置に挿入される。これらの手法はいずれも、周知の範囲の技術と見なされる。

ベクター内におけるDNA配列は、或る適切な発現制御配列（プロモータ）と行動に適応されて、メッセンジャーRNA合成を支配する。かかるプロモータの代表的な例としては、次の各々を挙げることができる。即ち、レトロウイルスSV40プロモータ、大腸菌(E. coli)のlacZ(ラクト糖)プロモータ、モード(トリプトファン)、ファージタムザルレプロモータ、

の他である。適切な宿主の選択は、この分野に精通する者にとって容易になし得ることである。

前述のとおり、選択された部位に挿入された適切なDNA配列を含む発現伝播体は、今問題の筋萎縮性側索硬化症のエピトープを認識する抗体を誘発し得るタンパク質に対して暗号付けをする遺伝子の一部ではないところの、DNA配列または遺伝子配列を含むものでもよい。例えば、所望のDNA配列は、発現の助長、純粋化の改善、あるいは適切なタンパク質の表現を可能にしたり、免疫原性を改善するようなDNA配列に対して、同一の解説枠内において、融合させたものでもよい。

つぎに、ワクチンを開発しようとする場合、中和化抗体または感染防御抗体を、天然抗原の不認識で立体構造依存性のエピトープに向って狙いを定めることもできよう。それゆえ、組織文化発現系から得られたタンパク質は、自然因縁においての、もとのタンパク質分子の3次元構造（立体構

特開平2-291271 (5)

造)とは可成り異なった立体構造を有する可能性があることを考慮に入れておかねばならない。かくして変異されたタンパク質の既免疫性に依存して再生させて、適切な分子的立体構造を回復させることが必要となり得る。タンパク質の再生の方法は、科学文献中に多數見出されるが、その方法は1)アルカリ、カオトロバー、有機溶媒、およびイオン式界面活性剤等の試薬を使用して、不正規にからみ合ったタンパク質を延性(ほどく)したのち、希釈、透析、またはpH調整によって再結して、延性を除去し、2)タンパク質を脂質又は脂質層中リボソームに再構成し、原免疫性タンパク質の構造のような膜を再構成するのである。

前述のとおり、或る場合には、クローン化伝播体に含まれるDNA配列が、或る特定の抗原に対して暗号づけをするといえ、発現されたタンパク質は、その抗原の断片のみであるかも知れない。例えば、宿主細胞として大腸菌を使用した場合、コドンTGAは、大腸菌にとって終止コドンであるから、クローン化伝播体内のDNA配列

が、アミノ酸トリプトファンに対するコドン、即ちTGAを含むならば、大腸菌はこのコドンを終止コドンと解釈するので、必ずしもすべての抗原が発現されるとは限らないわけである。

この発明は、2種のDNA配列から成る発現伝播体を提供するものであり、その一方(口)1種のマイコプラズマタンパク質に対する少くとも2種のDNA配列で、発現伝播体によって形質転換されるべき宿主によって、終止コドンと認識されるようなタンパク質の1つのアミノ酸に対する少くとも1つのコドンを有するものであり、他方は(口)1種の転換RNA(ヒーRNA)を暗号づけて、そのヒーRNAが、形質転換せらるべき宿主生物内の終止コドンに1種のアミノ酸を結合させ、そのアミノ酸を活性マイコプラズマタンパク質内に挿入するようにさせるDNA配列である。これによって、タンパク質合成が單回に終了することが防止される。

このヒーRNAは、1つの発現伝播体内に含まれているDNA配列を有し、このヒーRNAは、

問題のコドンによって暗号づけされた同じアミノ酸をマイコプラズマ中に挿入するところのヒーRNAであっても、または、他の異なる1種のアミノ酸を挿入するヒーRNAであってもよい。

かくして例えば、追加のDNA配列が、1つのヒーRNAトリプトファンを暗号づけしてもよい。このヒーRNAは、形質転換された宿主内の終止コドンに対して結合させ、アミノ酸トリプトファンを、合成されつつあるマイクロプラズマタンパク質内に挿入するものである。

あるいは、この追加のDNA配列が1つのヒーRNAを暗号づけし、このヒーRNAが形質転換された宿主内の終止コドンに対して結合させ、発現されたタンパク質内のアミノ酸トリプトファンの代りに、異なるアミノ酸、例えばチロシン、フェニルアラニン、またはイソロイシンを採用してもよい。

かくして例えば、発現伝播体中に追加のDNAを使用することは、TGAの終止コドンに結合するヒーRNAトリプトファンを宿主生物内で暗号

づけするところの、例えばトリプトファン(ヒーP)176またはヒーP178等のヒート遺伝子を暗号づけるものであって、これによってトリプトファンを挿入し、それによって、コドンTGA(これはマイコプラズマ内のアミノ酸トリプトファンに対して暗号づける)を含むところのマイコプラズマタンパク質の合成が早目に終了しないようにするものである。かつ、発現された組換え形マイコプラズマタンパク質は、上記のTGAコドンによって暗号づけされたトリプトファンを含むものである。

上記の追加のDNAが、トリプトファン以外の或るアミノ酸に対するヒーRNAの1つの変異体に対して暗号づけるならば、つまり例えば、TGAコドンに対して結合して、チロシン、イソロイシン、あるいはフェニルアラニンのいずれかを挿入させるところの、トリプトファンヒーRNA遺伝子またはイソロイシンヒーRNA遺伝子あるいはフェニルアラニント遺伝子に対して暗号づけるならば、発現されたマイコプラズマタ

特開平2-291271(6)

ンパク質内で、マイコプラズマ中で合成されるタンパク質中に普通に存在するトリプトファンの代わりに、追加のDNAによって暗号づけられるヒーラーRNAに相当する1つのアミノ酸が選択されるわけである。

1つの実例としては、コードTGAを終止コドンとして認識する生物（例えば大腸菌）を形質転換するために使用されるクローナ化伝播体は、DNA配列の一郎として1つのTGAコドンを有する所望の肺炎球菌体タンパク質に対して暗号づけるところのDNA配列も含まれること初回である。なおその他に、宿主生体内でコドンTGAに対して結合されて、形質転換される生体内で生成される肺炎球菌体のタンパク質連鎖の内部へ、トリプトファンを挿入するところの7-RNAに対して暗号付けをするような、1つのDNA配列を追加して包含させることができる。例えば、TPT176遺伝子に対して暗号付けする1つのDNA配列を1つのTGAコドンを有するDNA配列を有するクローナ化伝播体中へ挿入すること

を含む発現伝播体を提供する。この少くとも1種のDNA配列は、発現伝播体によって形質転換されるべき宿主生体によって、終止コドンであると認識されるようなタンパク質の1種のアミノ酸に対する少くとも1種のコドンを含む、1種のマイコプラズマタンパク質に対する。少くとも1種のDNA配列から形成されたものである。さらに、この少くとも1種類の終止コドンは、前記アミノ酸に対して暗号付けする他の1つのコードに突然変異されており、この変異されたコドンは、宿主生体によって終止コドンとして認識されないものである。このように1つのコドンから、終止コドンとして認識されないコドンに変換されることにより、タンパク質合成が早目に終結することを防止することができる。

例えば、74.5KD_B抗原の211位置にあるアミノ酸は、TGAと暗号付けされていて、通常これはトリプトファンに対する暗号であると共に、大腸菌はこれを終止コドンと認定する。TGAコドンを含むオリゴヌクレオチドは、例え

どもできる。このDNA配列は、所望の肺炎球菌体タンパク質に対して暗号付けし、大腸菌内でクローナ化伝播体を使用して、トリプトファンを含む所望の肺炎球菌体タンパク質を発現させるものである。かくして例えば後述の第3の実施例に示すとおり、分子量74.5KD_Bの肺炎球菌体抗原に対しても暗号付けするDNA配列と、セドウT176遺伝子を暗号付けするDNA配列とを含むするクローナ化伝播体によって、大腸菌を形質転換すれば、74.5KD_Bの肺炎球菌体抗原を、大腸菌内で発現させることができる。また第1の実施例のように、74.5KD_Bの肺炎球菌体抗原に対して暗号付けするDNA配列を含むするが、TPT176遺伝子に対して暗号付けするDNA配列は含まないところのクローナ化伝播体を使用して、大腸菌を形質転換すると、74.5KD_Bの肺炎球菌体抗原の断片を強制させることになる。

また、この発明によれば、1種のマイコプラズマタンパク質に対する少くとも1つのDNA配列

は部位指向性抗体などの突然変異によって変異するので、TGAコドンはTGGコドンに変換され、このTGGもトリプトファンに対する暗号である。つぎにこのオリゴヌクレオチド配列が置換されて、対応するTGAコドンを含む74.5KD_B抗原の遺伝子のDNA配列の一郎となる。かくして、宿主生体内のTGAコドンに対して適合するヒーラーRNAに対して暗号付けするような追加のDNA配列を必要としないで、74.5KD_B抗原の全長を発現するところの、発現伝播体を生成することができる。

この発明は、さらに、少くとも1種のマイコプラズマタンパク質について暗号付けする少くとも1種のDNA配列を含む発現伝播体を提供し、タンパク質合成の終結を防止する。この少くとも1種のDNA配列は、マイコプラズマタンパク質の第1のアミノ酸を暗号付けする少くとも1つのコドンを有する少くとも1つのDNA配列から形成されたものである。この少くとも1つのコドンは、第1のアミノ酸とは異なる1種または2種以

特開平2-291271(フ)

上のアミノ酸を暗号付けする、少くとも1つのコドンへ突然変異されたものである。複数のアミノ酸に対する1個以上のコドンを認知させることによって形成された1個または複数個のコドンを包含させることができるが、前者のコドンは、宿主細胞によって終止コドンとして認識されるものであり、これが変異されて新しいアミノ酸に対するコドンとして、終止コドンとして認識されない別のコドンとなる。あるいは、1つの複数アミノ酸には、測定の少くとも1種のDNA配列に追加して、形質転換されるべき宿主細胞内の終止コドンに対して結合するところの1つのmRNAを暗号付ける、少くとも1種のDNA配列を包含させることができる。このような終止コドンが存在し、活性マーカーを内へ1種のアミノ酸を組み入れならば、タンパク質合成の早期中断は防止される。

このような組換え型成の実例は、74.5KDの抗原のP116型であり、以下に述べる

であり、後述する。

この発明によれば、前記説明の形式のクローン化伝播体によって形質転換された宿主から生成されるタンパク質を、生理学的に許容しうる伝播体と関連させることにより、宿主の肺炎球菌に対する予防が可能となる。前記の指摘のとおり、このようなタンパク質は、前記肺炎球菌体の1個または複数種の抗原のエピトープを認識する抗体を誘導する機能を有する。このような発現されたタンパク質は、以下の説明中では「組換え形病原体抗原」と称することもあるが、前述のとおり、タンパク質が同時に断片や誘導体または融合生成物として含まれるような肺炎球菌体抗原と同一のタンパク質ではない。「組換え形病原体抗原」という用語は、断片、誘導体あるいは融合生成物をも含するものである。

組換え形病原体抗原は、肺炎球菌体に対する予防効果を達成する量においてワクチン内に組み入される。一般にワクチンの1回処方量は、少くとも0.5マイクログラムの組換え形病原体抗原

ように大腸菌によって表現される。

74.5KDの抗原と大腸菌とのKタンパク質との間には、可成りの配列相違が見られた。特に指摘されるアミノ酸中の相違点は、74.5KDの肺炎球菌体抗原の17と27位置におけるバリン残基が、大腸菌とのKタンパク質と比較して、抗原のこれらの区域における予測された細胞穿透特性を著しく低減させるとある。このようなタンパク質領域は、免疫系に対する抗原の有効な露出と深い関連性が見られる。部位指標形突然変異構造を使用すれば、17と27の位置におけるバリンは、それぞれシスティンとアルギニンによって置換させることができる。この2つの変化で、大腸菌とのKタンパク質中に存在すると予測される柱状ラセン構造の2つの区域を再生させる。この2種のアミノ酸残基置換を含む抗原体に対する1個または複数の遺伝子は、大腸菌発現ベクター中へ移行させることができる。発現された組換え形タンパク質の実例は、74.5KDの大腸菌抗原のP116型異体として既知

(以下、「病原体抗原」とする)を含有する必要があるが、好ましくは100マイクログラムの病原体抗原を含有する方がよい。多くの場合、20ミリグラム以上の量のワクチン中でも、前記の必要量の病原体抗原を含有していないのが通常である。

肺炎球菌体に対するワクチンに対して、「予防」または「予防する」という用語を使用する場合、それは、ワクチンが、宿主の肺炎球菌体を遮断すること、あるいはその肺炎症状の重症を軽減することを意味する場合と、その両者を含める意味にも使用する。

複数の処方が行われるとまでは、一般に8週間の間に3種以上の処方を行ってはならない。

組換え形病原体抗原との関連において使用される伝播体は、種々の伝播体のうちの何れか1種が使用される。適切な組合体の各実例としては、ワクチン用の蛋白質、明礬、合成高分子等の組合体が周知であり、適切な組合体の選択は、当該者にとって容易である。その選択は、ワクチ

特開平2-291271 (8)

ンの投与の方式によっても左右される。ワクチンは、注射用の処方でもよく、または筋肉下、筋膜内、皮膚内、あるいは皮下注射によっても行われる。また、ワクチンは、食物または水と混合しての経口投与、または凝剤形とする事も可能である。

その他種々の投与方式が考案されるが、この発明においては、特選の投与方式に限定されない。

またワクチンには、病原体抗体のまたはその断片の他に、活性成分その他の補助剤が追加されること、前述のとおりである。

またこの発明によれば、前記説明の形の肺炎病原体エンバク質抗原の1種を、特殊な結合体として使用することにより、肺炎病原体抗原に対する抗体を検出し、判定することが可能となる。

検査すれば、肺炎病原体抗体用の免疫検定法であって、その検定法中には、病原体抗原が結合体として使用され、特異的に病原体抗体を結合させるようとする方法である。

この検定法では、サンドイッチ形の検定器を使

き適切な動物に注射して得られる。

表面形ラベルは、酵素、放射性ラベル、色原体（ケイ光染料または吸光染料でもよい）その他の内から適宜に選択できる。ラベルの選定は周知の技術に属する。

抗体の固体保持器も、種々の固体保持器の中から適宜選択でき、その選定も周知の技術と見なされる。例えばマイクロ捕獲板、管、粒子等があるが、この発明ではいずれにも限定はしない。抗原は通常の方法で支持され、例えばコーティング、共用結合体等である。その選定も通常の技術と見なされる。

サンドイッチ形検定器は、種々の方法で進行でき、例えば「前進」、「後進」または「同時」があるが、前進法が最適である。

代表的な手法では、固体保持器に支持された病原体抗原を、まず病原体抗体を含むと思定されるサンプルに接触させて、サンプル中に存在するいすれか特定の抗体を、支持器上の抗原に結合させる。

用するのがよく、病原体抗原がバイオンドとして固体保持器に支持され、試料内にある病原体の特定の抗体と、結合された抗体とを結合させ、適切なトレーサーで判定されるものである。

このトレーサーは、着脱可能なラベルを付設したリガンドより成る。リガンドは、病原体抗体によって既往的に結合された形のリガンドで、このリガンドは既知の方法でラベル付けすることができる。

固体保持器上の病原体抗原に対して結合される病原体抗体は、例えば、1つの適切な着脱可能なラベルで表示された病原体抗体用の1つの抗体を使用することによって判別される。

このサンドイッチ式検定法では、病原体抗体に対してラベル付された抗体、モノクローナル抗体でも、多クローナル抗体でもよい。例えば多クローナル抗体は、薄膜封閉のグロブリシティ等でもよく、または特に肺炎病原体に対して用意された1つの抗体であればよく、これは通常の手順で生成されたものでよい。例えば、肺炎病原体抗体

固定保持器を洗浄したのち、病原体抗体に結合するトレーサーに支持器を接触させる。抗体がサンプル中に存在すれば、トレーサーは、固体保持器上の抗原に結合された抗体に結合されるようになり、支持器上のトレーサーの存在が、サンプル中に病原体抗体が存在することを示す。トレーサーの存在は、周知の手順で表面形ラベルの存在を判別することによって判断される。

サンドイッチ形検定法が最適ではあるが、病原体抗原の検定は他の方法もある。例えば、酵素検定法では、抗原がラテックス粒子などの固体粒子上において使用される。

また、この発明は、病原体抗体は前記と同様に支持して、トレーサーがリガンド（配位子）と表面ラベルより成る検定法、即ち1組の抗体キットとした検定法を提供する。トレーサーのリガンドは、病原体に結合されている。試験は、適宜なキット即ち試験パッケージに収納され、さらに緩衝剤等の他の成分を含ませることができる。病原体抗原は、固体保持器に支持させる方がよい。

(作用)

この発明の発現伝播体のDNA配列により、少くとも1種のタンパク質に対して遺伝座号を付与し、このタンパク質が病原体状態のエピトープを認識する抗体を誘導する効果を生ずる。

またこの発現伝播体により、宿主生物の形質転換を可能とする。

さらに、前記宿主によらず発現される少くとも1種のタンパク質を含有する予防ワクチンの選択を可能ならしめる効果がある。

(実施例)

以下、この発明の実施例を図面を参照して説明する。下記の各実施例においては、特に規定しない限り、特製、培養、および連続培養化は、マテニアティス他によるコールドスプリングハーバー研究所発行の「分子クローニング法と研究室手引」(1982)中に記載の方法による。また、形質転換は、コーエン他によるPNAS 68, 2110 (1973)中に記載の方法による。

また、特に規定しない限り、下記実施例中で使

タルコシルに溶解した3.87gの塩化セシウムより成る溶液中に混合した。生成された懸濁液を65℃で10分間培養して細胞を完全に溶解させた。ソーパルTV850ロータを使用して43,000 rpmで18時間の平衡浮遊密度式遠心分離によってDNAを分離し、これを18ゲージニードルで引伸した。このDNAを、ソーパルTV865ロータを使用して55,000 rpmで、それぞれ7時間と18時間の浮遊密度式遠心分離をさらに2回行い、各回に遺伝子DNAの帯を18ゲージニードルによって取出した。得られたDNA溶液を塩化セシウムで緩和させたイソプロパノールで抽出して臭化エチジウムを除去し、次いで10mM Tris pH 8.0の1mM EDTAに対して十分に透析分離し、イソプロパノールと塩化セシウムとを除去した。

遺伝子ライブラーの作製

肺炎病原体P-57223の200μgの遺伝子DNAの予備熟成を、1ml当たり200単位の制限酵素ECORIを使用して行い、8分後、

特開平2-291271 (9)

用される肺炎病原体(肺炎ハイオマイコプラスマ)抗原は、1988年9月28日発行のヨーロッパ特許出願第283,840号明細書中に記載の肺疾病原体から得られたものである。

(実施例1)

遺伝子DNAの7.5%アクリル酸アクリル酸の凝固

菌株P-57223(バーディ大学チャーチルズアームストロング博士より入手)を、1mlのワニース酸質中で育成し、1ml当たりの蛋白単位を約10°～10°の密度となった。細胞は遠心分離によって採取され、全容積3.25mlを与えるまでのリン酸で抽出した母液中に懸濁させた。この懸濁液を、1.0, 7.6mlと10mM Tris pH 8.0 1mMのEDTA(エチレンジアミン四酢酸)中に溶解した2.4.53gの塩化セシウムより成る溶液と混合し、これに1.0ml/mの臭化エチジウムを添加した。これを2.15mlの10mM Tris pH 8.0と、1mlのEDTAと、8.9%の

2.5分後、42分後、および63分後において、250μlの部分標本を採取した。

これらの部分的に熟成された病原体DNAの4種の試料を、混合して(200μg)、指紋開放式シロコ勾配法で処理した。この勾配液を、ソーパルAH627ロータを使用して25,000 rpmで15℃で21時間遠心分離させた。

この勾配液を、15滴分離することにより、底部から徐々に分離した(延計90分面積)。各分画量の20μlずつを、前記のとおり、1%の琼脂ゲル中に分散させた。18kbp(キロベースペア、塩基対1000個を1kbpとする)よりは小さく15kbpよりは大きいDNAの断片を含む分画液を採取し(32～40分面積)、TE(10mM Tris HC1 pH 7.5に1mM EDTAを添加してpH 8.0としたもの)に対して透析して、ショット分を除去した。ついでDNA(3.5ml)を、エタノールで沈殿させ、約15μlまで懸濁させて(1mg/ml)、-20℃で保管した。

特開平2-291271 (10)

バクテリオファージ・ラムダダッシュのEco R1（制限酵素）の施が、ベクタークローン化表記（ストラーダジン社製）によって得られ、このEco R1施は、濃度 1×10^9 単位/ mL においてT。リガーゼ（連鎖活性剤、ペーリングーGmb H社製）を使用して、容器積 $10\mu L$ 中に $2.5\mu L$ と $2.5\mu L$ の濃度にあるマイコプラズマ細胞のDN Aに対して、 $200\mu g/mL$ の濃度で連鎖錠型した。この連鎖反応を、常温で2時間加热させた。熱反応の $4\mu L$ を、試験管内封入形キット「ギガバック」（ストラーダジン社製）を使用して、ラムダ粒子内へ封入した。次にこのファージを、大腸菌の菌株 λ 2393（ストレイトラジン社製）上に固定し、 7.75×10^9 $\mu g/mL$ の量（ラムダダッシュの 3.1×10^9 $\mu g/mL$ に相当する）が定量された。

免血清

1. 猫の免疫抗体。ニュージーランド最高白色種毛を、完全フロイント補體（セントルイス市シグマ社製）中で、肺炎球菌体菌種J（ATCC 2

5 KDa の抗原を採取した。1-Dウェスタン法プロット分析によれば、單一のマイコプラズマ $74.5 KDa$ タンパク質に反応する過剰免疫性血清と、また2-Dゲルウェスタン・プロット分析によれば、2種のタンパク質に反応する過剰免疫性血清が認められた。この $74.5 KDa$ 抗原は、日本国特願昭63-258427号に記載された方法によって調製され、この特願昭を、現出頭の一節として引用するものとする。

3. 家族の免疫血清

バーデューの小形家豚に、完全フロイント補體中に混入させた、 $100\mu g$ の電気泳動純化 $74.5 KDa$ 抗原によって、免疫性を付与した。第1回の注射から2週間後に、同一の注射を行った。1-Dおよび2-Dゲルウェスタン・プロット分析により、單一のマイコプラズマの $74.5 KDa$ のタンパク質に反応する過剰免疫性血清が認められた。このタンパク質は、過剰免疫性のマウス血清によって認識される2種の内の一方のものと同一のタンパク質である。これらの

5934 ）の約 10^{11} 赤色単位量を使用して免疫性を付与した。第1回の注射の2週間後に、完全フロイント補體（シグマ社）中に混入した同じ抗原の補助注射を行った。過剰免疫性血清が、 $30\mu g$ 以上のマイコプラズマタンパク質に対して反応することが、1-Dゲルウェスタン法分析により判明し、2-Dゲルウェスタン法分析によれば、分子量約 $74.6 KDa$ （キロ・ダルトン）の2種のタンパク質に対して反応することが判明した。

2. マウスの免疫血清。

前記と同様な方法で、單一種の血清を調製したが、下記の点では相違する。即ち、菌株 λ へ 57.223 （バーデュー大学C.アームストロング博士提供）から電気泳動法による約 $10\mu g$ の分子量 $74.5 KDa$ （キロダルトン）の純度抗原によって、D B A / E のマウス（はつかねずみ）に免疫付与し、さらに同一抗原で補助免疫を行った。1988年9月26日発行の日本国特願昭63-258427号記載の方法により、 $74.$

家豚は、ワクチン投与によるマイコプラズマ性肺炎からの予防の一つの目安となった。

遺伝子ライブリリーのスクリーニング

ライブリリーは、兔の対肺炎病原体（これは、他のマイコプラズマ表面タンパク質の他の分子量 $74.5 KDa$ の抗原をも免疫学的に認識する）によって送りわけられた。約 200 種の遺伝子組換え体が、兔の免疫血清に対して免疫学的に反応したので、これら約 200 種が第1次選別によって選択された。これらの組換え体は、電気泳動法によって精製された抗原に対して生成された、マウスの対 $74.5 KDa$ タンパク質によってさらに選別された。 10 種の組換え体が、大腸菌内で同一種の血清と免疫学的に交叉反応する物質を生成することが認められ、この 10 種の組換え体が選択された。

分子量 $74.5 KDa$ 抗原に対する遺伝子の分離選択

74.5 KDa抗原の部分的アミノ酸配列に基づき、下記の構造のC00538と559のオリ

特開平2-291271 (11)

ゴタクレオチド配を合成した。なお、各アミノ酸の記号は、A₂u (アラニン)、L₂y (リジン)、G₂u (グルタミン酸)、I₂u (イソロイシン)、Leu (ロイシン)、G₂y (グリシン)、Asp (アスパラギン酸)、Ser (セリン)、Val (バリン)、Asn (アスパラギン)、G₂h (グルタミン)、Pro (プロリジン)である。塩基は、A (アデニン)、G (グアニン)、T (チミン)、C (シトシン)を表し、他の実施例においても同様とする。

COD 558

1

Ala-Lys-Glu-Ile-Ile-Leu-Gly-Ile-Asp-Leu-
 AAA GAA ATA ATA TTC GAG
 G G G CCA
 T T T
 C

COD 559

15

Ser-Val-Val-Leu-Ile-Asp-Glu-Asn-Gln-Lys-Pro
 GTG CTG ATA GAC GAA AA
 A T G T G
 T T
 C

免疫能動性のこの I 0 相の遺伝子組換え体から DNA を調製し、大腸菌によって培養し、ゲル電気泳動法によって分析された結果、各々が、若干個の制限酵素 Eco RI の断片より成る脳炎病原体の染色体の各部分より成ることが認められた。この異種交配遺体は下記のとおりである。

異種交配法

6 X NET

6 X デンハルツ

2 X 10⁻⁴ cpm キナーゼ・プローブ

37°C

1 時間

洗浄 6 X NET

0.1% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)

常温において 3 X

37°C において 2 X

6 X NET

1 ミリモル NaCl

0.05 ミリモル Tris pH 7.6

6 ミリモル EDTA

サン・プロット分析により、COD 558 と COD 559 は共に、異種交配により、I 0 相の組換え体のうちの 6 種に存在する、大きさ 7.8 kb の塩基対 (bp) (長さは 7.8 キロベース (kb)) の Eco RI 制限酵素断片になるものと想められた。この断片を二次増殖させるために、長さ 7.8 kb 断片 (他の継続する断片に加えて) を含む転換体をラムダ S-5-5 と呼称し、その DNA を調製して、酵素 Eco RI によって育成させ、Eco RI で育成されたベクター pWHA148 に接合させて、大腸菌 (E. coli) の菌株 JM83 に形質転換させた。形質転換体の 1 つを pMYCO16 と命名した。その DNA は、調製されたのち、種々の制限酵素 (内因性核酸分解酵素) によって育成させて、第 5 図中の制限マップを引出すようにしたものである。なお以下において、1,000 個のタクレオチド対を 1 キロベース (kb) とし、DNA 部分の長さを表す。

ベクター pWHA148 は、合成オリゴヌクレ

オチドを、pUC18 の Hinc II 位の部位に挿入することによって生成される。B-ガラクトシダーゼの X 相補形ペプチドのアミノ酸末端符号付け配列は、第 7 図のとおりで、現の pUC18 上に、追加の 8 個の制限部位を含む、pUC18 のオリゴタクレオチドは、第 7 図のように、SPRI と Hinc II 位の部位の間に挿入される。この第 7 図は、プラスミド pWHA148 内に生成された B-ガラクトシダーゼ融合タンパク質の pUC18 の配列と、付加された終点と、予想されるアミノ酸配列を示す。下段の文字は、pUC18 のヌクレオチド配列の部分で、上段の文字は、pWHA148 の合成オリゴタクレオチド付加のタクレオチド配列を示す。数字は、予想されるアミノ酸配列の順序を示す。

COD 558 と 559 は、サン法分析によれば、pMYCO16 の長さ 0.6 kb (キロベース) AccI-Acu 制限断片に異種交配された。0.6 kb 断片の DNA 配列分析によれば、1) COD 558 と COD 559 との類似性の範

特開平2-291271(12)

図を含むし、2) 断片のDNA配列によって予測されたアミノ酸の3種を除いてその他は、下記のとおり、分子量74, 5kDaに対して判別されるタンパク質配列に適合している。両記以外のアミノ酸の記号は、Meth (メチオニン) とThr (トレオニン) である。

タンパク質 1 配列	--Ala Gly Glu Ile Ile Leu Gly Ile Asp
クローン 配列) met ala lys glu ilo ilo leu gly ilo asp
タンパク質 11 配列) Leu Gly Thr Val Asn Ser Val Val Leu Ile
クローン 配列) leu gly thr thr asn ser val val ala ilo
タンパク質 21 配列) Asp Glu Asn Gln Lys Pro Val Val Leu
クローン 配列) ile glu asn gln lys pro val val leu

実際のアミノ酸配列をさらに再分割した結果、3個の不適合は、アミノ酸の特異が不明確だったためと考えられる。

た。得られた複合物の一部をポリアクリルアミドゲルで電気泳動させると、新たに43kDaのタンパク質が特異された。

このpMYC016の43kDaの発現生成物は、ウェスタン・プロット分析によれば、74, 5kDaの肺炎球菌体抗体に対して増強されたマウス血清に対して反応することが認められた。

このpMYC016の43kDaの発現生成物は、ウェスタン・プロット分析によれば、74, 5kDaの肺炎球菌体抗体に対して生じられる抗体免疫血清に対して反応することが認められた。

太陽菌によって生産される74, 5kDa抗原断片の部分構造

大腸菌株CY15000形質転換体の1つを選び、1リットルの培養汁で37℃で外径OD₆₂₀ = 2となるまで生長させ、遠心分離によって細胞を採取した。M9培養液中で再懸濁することにより、細胞を行東培養成分のないように洗浄し、再び遠心分離によって採取する。得ら

る5図中、pMYC016の側面マップ中では、遺伝子は、長さ0.6kbのA C C I - A SとII側鎖断片内で開始し、0.4kbのA s u u - S e s I、1.2kb C l a I - C l a I、および1.4kb C l a I - H i n dの各断片内を時計方向に延長して、H i n dの部位の短部で終了する。

太陽菌内における添加抗原体74, 5kDa抗原遺伝子の発現

pMYC016からのDNAは、大腸菌株CY15000に形質転換された。転換体の1つを選択し、OD₆₂₀ = 2へ37℃でし肉汁中で生長させ、細胞は遠心分離法によって採取された。細胞をM9培養液中で再懸濁させ、汚染細菌成分がないように洗浄させ、再び遠心分離して採取した。得られた細胞ペレットを、0.5mg/mlの加熱由リゾチームの25mM Tris pH 8.0の10mM EDTAへの溶液中で、原始細胞体積の1/5分の1で再懸濁させた。25℃で10分間培養し、0.5mlを1秒間超音波処理せ

れた細胞ペレットを、0.5mg/mlの加熱由リゾチーム（細胞溶解酵素）を25mM Tris pH 8.0の10mM EDTAに溶解した溶液の20ml中に再懸濁させ、25℃で10分間培養し、2部分に分割し、各々を0℃で60秒間凍とうさせた。得られた液体を、4℃で10分間13,000×gで遠心分離して、不溶の固形分を分離した。十分な量(4, 52g)の低酸アソニウムを加えて40%上澄液を50%氷和まで到らしめ、遠心分離によって不溶のタンパク質を採取し、ポリアクリルアミドゲルを加えて電気泳動させた。ウェスタン・プロット分析（前記の小形球菌血清を使用する）によれば、43kDaのpMYC016の発現生成物を含むことが認められた。濃縮した抗原分離を、ワクチンとしての使用前に、PBSに対して遠折した。

(実施例2) 41kDa抗原体抗原

バクテリオファージ・ラムダダッシュのE.coli (制膜酵素) の脛が、ベクタークローン化装置（ストレイタジン社製）によって得られ、これ

特開平2-291271(13)

を、濃度 100 単位/ $m\ell$ にある T 4 リガーゼ (BMB) を使用して、全容積 10 $\mu\ell$ 中に 2.5 $\mu\text{g}/m\ell$ の濃度にあるマイコプラズマの目標の DNA に対して、200 $\mu\text{g}/m\ell$ の濃度で処理された。この連絡反応は、常温で 2 時間熟成された。連続体の λ ルクスを、ストレイタジン社製の試験管内封入形キット「ザガバグ」を使用して、ラムダ粒子内へ封入した。次にこのフージを、大腸菌の菌株 P 2392 (ストレイタジン社製) 上に滴定し、 $7 \cdot 7.5 \times 10^4$ $\mu\text{f}\mu\text{l}/m\ell$ の量 (ラムダダッシュの $3 \cdot 1 \times 10^4$ $\mu\text{f}\mu\text{l}/m\ell$ に相当する) が定量された。

温度オリゴヌクレオチドプローブの構成

41 KD の脳組織原体の陽性の部分的アミノ酸配列を順序付けできちような、すべての可能性の DNA 配列が確認された。1 ラジカル対 (bp) から成る 2 個所の配列も特定された。2 種の混成配列オリゴヌクレオチドプローブが、COD 447 と COD 455 として合成された。下表は、分子量 41 キロダルトルの抗原遺伝子のスクリーニング

ライブライバーを示す。

$\text{-Gly-Tyr-Val-Lys-Pro-Gly-Cin-Ile-Met-Ala-Lys-Cys-}$					
Cod 455			Cod 447		
G	G		G		
T	T	A	T	A	T
TCC	TAC	GTA	AAG	CGA	GG
			CAC	ATC	GCA
C	C		A	C	G

アミノ酸および塩基の記号は前記のものと同様である。

前記実施例 1 のライブライバーを、5 枚のペトリ板上にあって、135 mM ベトリ板当り 2000 $\mu\text{f}\mu\text{l}$ の濃度の大腸菌株 E 392 の上に配置した。各ペトリ板から 2 個のニトロセルロースフィルタを挿上げ、W. D. ベントンおよび R. W. デービス (サインス系譜: 1977 年 1 月 8 日公報) の方法によって処理した。

フィルタを乾燥したのち、0.8 M NaCl, 90 mM Tris-HCl, pH 7, 5 mM EDTA より成る溶液中で再び湿润させた。これらのフィルタを袋に納め、2.5 $m\ell$ の予備異種交配用溶被フィルタを追加した。

この予備交配用 / 异種交配用溶被の組成は、($m\text{M}$ はミリモル)

6 X NET

5 X デンハルツ

0.1 mM γ -ATP (アデノシン三リン酸)

1.0 mM NaPPi

10.0 mM Tris-HCl, 5% の胰凝ナトリウム

0.2% SDS

0.1 mg/ $m\ell$ の超音波処理した酵母の DNA

250 $\mu\text{g}/m\ell$ の大腸菌の軽量 RNA

異種交配の予備操作は、37°C で 2 時間行った。次に予備交配用溶被を、袋から漏下させ、各袋毎に 3 $m\ell$ の第 2 の子孫交配用溶被を添加した。第 2 の溶被は、第 1 の溶被と同一成分の他に、100 $\mu\text{g}/m\ell$ のラムダ λ DNA の 1 $m\ell$ と、362 $\mu\text{g}/m\ell$ の大腸菌 DNA の 5 $m\ell$ とを、50 $m\ell$ 当たりに追加したものである。両方の DNA を、大きさ 900 bp 以下になるまで超音波処理し、10 分間煮沸し、使用直前に

に急冷した。フィルタを、この溶被中で 37°C で 2 時間予備処理を行った。

プローブを下記によって活性化した。即ち、1.8.5 μg (マイクロリットル) の γ -ATP (7000 Ci/mMole) を使用したと、4 μg の COD 447 (2.000 $\mu\text{g}/m\ell$) か、あるいは 4.9.0 μg の γ -ATP (7000 Ci/mMole) を使用した 6.5 μg の COD 455 (2.000 $\mu\text{g}/m\ell$ を含む) を、20 単位の T. 付活性 (ベーリンガー社製) を含むする 80 μl の反応混成液中に混入させた。

付活性化した各プローブに、10 $m\ell$ の予備交配用溶被を添加した。袋から予備交配溶被を漏下除去し、プローブを含む交配用溶被を、各フィルタ当たりに約 2 $m\ell$ 添加した。これらを 1 晩 (約 16 時間) 37°C で培養させた。

各フィルタを 1 リットル 6 X SSC 中で 10 分間 1 回ずつ透析で 4 回洗浄したのち、100 $m\ell$ の 3 M 塩化イメチルアンモニウムと、50 mM Tris-HCl で pH 8.0 とし、2 mM の EDTA

特開平2-291271(14)

と、 $1\text{mg}/\text{ml}$ のSDS (TMAC) (DNA 記、B2、1585~1588頁による)とを添加した複数中で蒸温で10分間ずつ回流洗浄した。次に各フィルタを、 100mM TMAC 中で、50℃で10分間洗浄した。フィルタをサンダップで包み(最初はフィルタを乾燥させないため)、-80℃で2重結晶スクリーンによって1箇所ダックXAR5に露出させた。COD445とCOD447の両者に対して異種交配を示す適切な溶菌斑を抽出し、DNAを調製した。このDNAを酵素EcoRIで培養し、2個の1%琼脂ゲル上で電気泳動処理を行った。このゲルをサザン式プロット法で検出した。このサザン・プロットは、COD447またはCOD455に対して異種交配された。これによって、2種のフージが、COD447とCOD455の両者に対して交配した2.5kb (キロ塩基対) の酵素EcoRIの断片を含むことが確認された。これらのフージを、ラムダマイコ1とラムダマイコ2と命名した。

上記を2次分選増殖させるために、pMYC01からのDNAをXbaIとHindIIIで培養し、長さ0.2kbの断片を精製し、XbaIとHindIIIで培養されたベクターpWH14に連結させて、大腸菌株JM83に形質転換させた。転出体の1種をpMYC04(第2図)と命名し、そのDNAを調製して、XbaIとHindIIIで培養し、第2図の制限マップが得られた。

長さ0.2kbの断片のDNA配列を分析して、それが1) COD455とCOD447と相同性のある部分を含むこと、および2) このDNA配列から予測されるアミノ酸は、その3種を除いた他のすべてが、41kDa抗原に対して認められるタンパク質配列に一致することが判明した。これを下記に示す。

ラムダマイコ1とラムダマイコ2の大腸DNAの調製は、山本、K. R. 他による文献(1970年ウエルス学会誌40の734頁)によって行った。ラムダエコリからのDNAを酵素EcoRIで培養し、E. coliで培養したベクターpUC9に連結させ、大腸菌株JM83に転換させた。形質転換体の1種をpMYC01(第1図)と命名し、そのDNAを調製して、種々の制限酵素によって培養させて、第1図の制限マップが得られた。ラムダマイコ1とpMYC01との制限マップを比較することにより、pMYC01中のマイコプラズマの付加された、長さ1.0kbのEcoRI酵素の断片は、実際は、ゲノム内の長さ2.5kbのEcoRI酵素の断片の近傍にはないことが判明した。

COD455とCOD447は、サザン式プロット分析により、pMYC01の長さ0.2kbの酵素XbaI-HindIIIの制限断片へ異種連結されたことが判明した。DNA配列分析に対して、長さ0.2kbの酵素XbaI-Hind

タンパク質 1
配列) Met Asp Lys Phe Cys Tyr Val Lys Pro Gly

クローン) met asp lys phe arg tyr val lys pro gly

タンパク質 11
配列) Gin Ile Met Ala Lys Eys Glu--Ile/Met Ile

クローン) gin ile met ala lys asp glu glu met ile

タンパク質 21
配列) --- Phe Leu --- Ile --- Ile Asn Leu Leu

クローン) arg phe leu asp ile asp gly asn leu leu

異同のアミノ酸配列を改めて分析して分ったことは、3個所に不適合があり、これはアミノ酸の特定が不明確なためと推定された。

ラムダマイコ1の制限マップ(図示せず)の一断片を分析した結果、長さ0.2kbのXbaI-HindIIIの断片が、マイコプラズマDNAラムダベクターの恒発点の1つから約1.5kbの位置にあることが分った。すべての遺伝子を分

特開平2-291271 (15)

増殖するために、ラムダマイコ-DNAをXbaIとKpnIによっては断し、XbaIとKpnIで増殖されたベクター-pWHA148に接合して、大腸菌株JM83に形質転換させた。その1種をpMYCO15(第3図)と命名し、そのDNAを kopieして、若干の異なる制限酵素で接着し、第3図の制限マップが得られた。

転換体pMYCO15のマイコプラズマDNAの部分のDNA配列を分析した結果、全長41kDaの抗原遺伝子が含まれることが分った。pMYCO15の制限マップ上で、遺伝子は、長さ0.2kbのXbaI-HindIIIの断片内に始まって、時計方向に0.5kbのHindIII-EcoRIと1.2kbのEcoRIの各断片内を走り、EcoRI部位の0.8kb手前で終わっている。遺伝子のDNA配列めら求められたアミノ酸配列は、第14図のとおりである。

大腸菌内における脳炎病原体41kDa抗原遺伝子の発現

分子量41kDa抗原のDNA配列は、暗号付

け配列内に14個のTGAコドンが存在することを示した。TGAコドンは、マイコプラズマ中のアミノ酸トリプトファンを指定するが、通常、大腸菌内のタンパク質の伸長を終了させ、従って大腸菌内における41kDa抗原の発現の結果、遺伝子で暗号付けされたペプチドから、第1のTGAで暗号付与されたトリプトファンまでを飛越することが判明している。この41kDa抗原の断片の発現を増大させるために、pMYCO1(第1図)を、酵素HindIIIで接着し、長さ1.3kbのHindIIIの断片を kopieして、HindIIIで増殖させたpMYCO4(第2図)に接合させ、大腸菌株JM83に転換させた。転換体の1種をpMYCO8(第4図)と命名し、そのDNAを kopieして、若干の酵素で接着し、第4図の制限マップが得られた。

長さ0.2kbのXbaI-HindIII断片内にある、41kDa開始メオニンは、ベクター-pWHA148内にあるラクトースプロモータから約0.2kbの距離にある。TGA終止コドン

は、長さ0.5kbのHindIII-EcoRI断片内に存在する。

pMYCO8からのDNAは、大腸菌株CY15000に形質転換された。転換体の1種を接着し、L-肉汁中で37℃でOD_{600nm}=2となるまで成長させ、遠心分離によって細胞を採取した。M9培地液中で再懸滴させることにより、汚染物質のないように細胞を洗浄し、再び遠心分離して採取した。0.5mg/mLの鶏卵白リゾチームを、25mM Tris pH8.0とした10mMのEDTA液中に溶解した溶液中に、採取された転換体のセルベレットを、最初の培養体積の1/5分の1で再懸滴させ、4℃で15秒間超音波処理する。得られた液を、ポリアクリルアミドゲルの電気泳動で処理し、新たに14kDaのタンパク質が確認された。このタンパク質は、第1のTGAコドンまでの遺伝子で暗号付けされたペプチドから成る41kDaの抗原の断片についての予測された分子量を有するものである。

DBA/2のマウスを、脳炎病原体から分離された、20マイクログラムの電気泳動で精製した41kDaの抗原を完全フロイント免疫助成剤に入れたもので、免疫性を付与した。

最初の注射の2週間後に、完全フロイント免疫助成剤中で、補助注射を行った。脳炎病原体の全タンパク質のウェスタン法プロット分析により、免疫血清が、100分の1希釈において、特異的に41kDa抗原と反応することが判明した。この転換体pMYCO8の14kDa発現生成物は、ウェスタン法プロット分析により、41kDa脳炎マイコプラズマ抗原に対して作成されたマウス免疫血清と反応することが判明した。

(実験例3)

以下、脳炎病原体の全長が分子量で74.5kDaの抗原の大腸菌内における発現について説明する。

第5図のpMYCO16DNAは、酵素AspIで接着され、豆科の植物の核酸分解酵素で処理して、単一鎖構造のAccI尾端を除去し、リ

特開平2-291271(16)

ガーゼ処理して、74.5kDa抗原遺伝子の前面にある長さ1.9kbのEcoI断片を除去して、大腸菌株JM83の内部に形質転換させたものである。この転換体の1種をpMYC029と命名し、そのDNAを、多段の制限酵素で培養して、第8図の制限マップが得られた。

このpMYC029のDNA配列を分析した結果によれば、自然的欠失が、リガムゼ接合部位に存在し、2個の塩基が欠失されており、PstI 1部位は保持され、下記のとおりである。組し、S'から3'までの鎖状構造のみを図示した。

pMYC029

予想された 順序 TTGCATGGCTGGCAGGTACTTTCTTTGTCT
配列 PstI

組成された 順序 TTGCATGGCTGGCAGGCTTTCTTTGTCT
配列 PstI

プラスミドpMYC031の構成と、分子量
74.5kDa抗原断片

pMYC029のマイコプラズマ導入は、pW

HA148のラクトース(レバ)プロモータから遡り位置にあるので、遺伝子を他の発現ベクターであるpUC9に挿入することが必要と考えられた。2個の塩基の欠失によって、分子量74.5kDaの抗原に対する遺伝子は、大腸菌のベクターpUC9のベータガラクトシダーゼ遺伝子と同様な競争性に阻かせることができた。

この構造を完成するために、pMYC029のDNAを、PstIとEcoIで培養し、74.5kDaの全體の順序配列を含むEcoI-EcoR I断片を精製し、PstIとEcoR Iで培養されたベクター-pUC9に接合させて、大腸菌株JM83へ形質転換させた。この転換体の1種をpMYC031と命名し、そのDNAを測定したのち、実施例1の転換手法により、大腸菌株CY15000中へ形質転換させた。

プラスミドpMYC032の構成

プラスミドpCAM101を、コロラド州ボウルダのコロラド大学のジェームス・カラン氏から

購入した。これは、第10図に示すとおり、トリプトファンT176遺伝子の肝臓な根源として利用できる。pCAM101からのDNAを、酵素EcoR Iで培養し、トリプトファンT176遺伝子を含む長さ0.3kbのEcoR I断片を精製し、EcoR Iで培養したpMYC031に接合させて、大腸菌株CY15000中へ形質転換させた。この転換体の1種をプラスミドpMYC032と命名し、その制限マップを第11図に示す。

細胞膜原体マイコプラズマ74.5kDa抗原の大腸菌中における発現

CY15000(pMYC032)形質転換体の1種を選択し、レーニングで成長させ、前記同様に液体試料を調整して、その一部をペリアクリルアミドゲル中で電気泳動処理を行った。ゲル電気泳動分別により、新たに分子量75kDaと43kDaのタンパク質が特定されそれが大腸菌タンパク質の約5%および0.1%であった。pMYC032の75kDaタンパク質は、ウェス

タン法プロット分析により、前述の74.5kDa細胞膜原体抗原に対して作成された抗原の免疫血清に対して反応することが認められた。

(実施例4)

以下、肺炎マイコプラズマの分子量74.5kDaの抗原のワクチンとしての使用について説明する。

CY15000(pMYC032)形質転換体の1種を実施例3から選択し、14リットルのシェーマップ培養器内のM-9組成液の最少量中で、細胞密度が1100.D.となるので培養させた。遠心分離により、500ml以上から、600mlおよび120g(湿潤重量)の細胞を採取した。12mMのEDTAと0.5mM/mgのリソチームを含むPBSの10ml当たりに、2.3gの細胞より成る懸濁液を作成した。懸濁液を25℃で15分間熱滅させ、30秒バーストして2分間水上で超音波処理し、4℃において10分間13,000gの加速度で遠心分離させ、浴液分画を生成分として得た。生成物の一部をポリア

特開平2-291271 (17)

クリルアミドゲル中で電気泳動処理した。可溶性タンパク質の約25%から作成された遺伝子粗画文形の74.5kDa抗原と、実体物中の74.5kDa抗原の量に基づく供与液を、PBS中で1液と豆当り200μgと1000μgを作成し、豚肺に投与する直前に、フロイント社の未完成功能剤（シグマ社製）の等容液で氷上で乳化させた。

ワクチン試験

第0週 ハンダシチャイダ種、ハンダシチャイアメデュロックの稚仔およびヨーク種の3頭の仔豚（無菌飼育区より入手）
 第1週 ランダムに7群の仔豚群に分割し、各群毎に足の皮下にワクチン接種
 第3週 上記同様で、反対側の脚に補助ワクチン接種
 第5週 16%台ごとの肺炎マイコツラズウ病原体の経気管注射により抗原投与
 第12週 供試仔豚の解剖検査の結果剖検結果は下記のとおりであった。

ミノ酸配列とを比較して次の表が得られた。

タンパク質 1) Met Ala Asn Ile/Ser Ile/Asp Ala/Lys Ile
配列

クローン) met ala asn ser asp lys ile
配列

タンパク質 0) Ala Leu Asn Gly/Asn Ala/Ile Met/Gly Ala
配列

クローン) ala leu asn asn ile gly ala
配列

すべての遺伝子を分離増殖するために、第3回のPMYC015をFspIとHindIIIで切断し、HindIIIとSmaIで切断されたベクターのpUC9 (TGAサンブレッサを欠くベクター)とpWHA160 (TGAサンブレッサを行するベクター)に接合して、大腸菌株JM83中へ形質転換させた。pUC9の転換体の1種をPMYC039と命名し、pWHA160の転換体の1種をPMYC040と命名した。これらのDNAを調製し、透析槽の制限酵素で培養して、第12回と第13回の制限マップを作成した。

グループ	発生*	頻度**
制御	5/5	12.4±4.7
100μg 74.5kDa 抗原	1/4	1.2±4.9
200μg 粗画文形	2/8	9.7±11.7
74.5kDa 抗原		
1000μg 粗画文形	1/4	25.0±6.1
74.5kDa 抗原		

* 5%以上の肺部病變のある仔豚の数

** 肺部を含めた肺の表面（平均土標準偏差）

(実験例5)

肺炎マイコツラズウ病原体の分子量36kDaの抗体の大腸菌内における発現について説明する。

ラムダマイヨー1. (実験例2) から得られた副コロニーのDNA配列の分析の結果、長さ1.2kbのEcoRI-EcoRIの断片は、36kDa抗原の暗号配列の位置部分に相当する開いた読み取り枠を含んでいる。病原体から精製された真正の36kDa抗原に対して得られたアミノ酸配列と、この開いた読み取り枠から推論されるア

ベクターpWHA160は、ベクターpUC9のEcoRI部位に挿入されたプラスミドpCAGM101からのトリプトファンT176遺伝子を含む256対の塩基対のEcoRI断片より成るもので、ラクトースプロモータから翻訳されるものであった。

プラスミドpMYC039とpMYC040からのDNAは、大腸菌のCY15000株に形質転換された。各転換体を選択し、L-肉汁中で37℃でOD₆₀₀ = 2になるまで増殖させ、遠心分離によって細胞を採取した。M9緩衝液中で再懸滴させて、細胞群を盤底からの汚染のないように洗浄し、再び遠心分離によって採取した。得られた細胞ペレットを、0.5mg/mLの凍結保存のリゾチームを、25mM Tris pH8.0の10mM EDTAに溶解した溶液中で、最初の培養容器の15分の1で再懸滴させ、25℃で10分間熟成させ、4℃で15秒間超音波処理した。採取帽皿被の被膜と、可溶分と細胞部分を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で処理

特開平2-291271 (18)

し、プラスミド pMYC039 と pMYC040 の細胞部と被膜部の各々中に、それぞれ新たに分子量 29 kDa と 36 kDa のタンパク質が確認された。この 29 kDa と 36 kDa の組換え形タンパク質が、全体の抗原を含むものと推定される。

免疫血清

無菌飼育で、初乳を与えない豚豚を、実験的に肺炎病原体に感染させ、回復期の期間に血清を採取した。肺炎病原体タンパク質のウェスタン法プロット分析によれば、分子量 36 kDa の抗原を含む多種のマイコプラズマタンパク質の 5 分の 1 の濃度に対して、免疫血清が反応することが判明した。プラスミド pMYC039 の 29 kDa タンパク質および pMYC040 の 36 kDa タンパク質は、ウェスタン法プロット分析により、回復期の豚豚血清に対して反応することが判明した。

DBA/2 のマウスを、完全免疫助成剤中で、電気泳動法で精製した分子量 36 kDa 抗体（肺

1 の希釈において、特異的に 36 kDa 抗原と反応することが認められた。

これらの結果の示すことは、プラスミド pMYC040 から生成された 36 kDa タンパク質は、肺炎病原体 36 kDa 抗原の遺伝子組換え型複製体であるということである。

組換え形の 36 kDa 抗原から、被膜タンパク質の約 10 % が生成され、試料中の 36 kDa 抗体の量に基いて、各投与量が、1 ml 当り 50 マイクログラムの濃度で PBS (リン酸緩衝化食塩水) 中に作成され、豚豚に投与する直前に、等量のフロイント未完成助成剤 (シグマ社製) を加えて氷上で乳化させた。

プラスミド pMYC050 の開発

プラスミド pMYC040 のラクトースプロモータは、分子量 36 kDa 抗原遺伝子の出発点から 1000 対以上の塩基対である。1つの遺伝子とそのプロモータとの間の距離を増加すると、多くの場合、組換え形タンパク質の発現を促進させることが多い。組換え形 36 kDa 抗原の発現

（炎症原体から分離した）の 10 マイクログラムによって沈殿性を付与した。第 1 回接種 2 週間後に、不完全フロイント助成剤中で、補助接種を行い、マウスを 1 週間後に採血した。肺炎病原体タンパク質の全量をウェスタン法プロット分析して、免疫血清が、100 分の 1 倍希釈において、特異的に 36 kDa 抗原と反応することが認められた。プラスミド pMYC039 の 29 kDa タンパク質および pMYC040 の 36 kDa タンパク質は、ウェスタン法分析により、病原体抗原に対して作成されたマウスの免疫血清に対して反応することが認められた。

また、DBA/2 のマウスを、完全免疫助成剤中の、電気泳動法で精製した 36 kDa タンパク質 (pMYC040 を含む大腸菌より分離したもの) の 10 マイクログラムによって免疫処理した。第 1 回接種 2 週間後に、不完全フロイント助成剤中で、補助接種を行い、1 週間後にマウスから採血した。肺炎病原体タンパク質全体をウェスタン法プロット分析して、この血清が 100 分の

レベルを高める意図に基づき、pMYC040 から分離された DNA は、酵液中 1.5 日で培養し、さらに T4 リガーゼを使用させて、大腸菌の JM103 株に形質転換させた。転換体のその 1 株を第 15 回のプラスミド pMYC050 と命名し、その DNA を複製し、制限酵素によって培養して、第 15 回の側面マップを作成した。pMYC050 のラクトースプロモータは、約 800 対塩基対の位置に、pMYC040 中におけるよりも、36 kDa 抗原遺伝子の出発点に近い所にある。

プラスミド pMYC050 からの DNA を大腸菌の CY15000 株に転換させた。数種の転換体を選択し、L-肉汁中で 37 °C で 0.0... = 2 なるまで増殖させ、全菌液およびトライトン可溶分画液を回記向性に調製した。なお、この分子量 36 kDa のタンパク質の発現は、pMYC050 内の TGA サブレッサーによって左右される。これは、pMYC039 には、Hind II によって生じる同じく 800 対塩基対の欠失があるためにそ

特開平2-291271 (19)

れを発現できないからである。

前記飼育された豚豚に、P M Y C O S Oから得た粗挽え形3 6 K Dュタンパク質の約1 0 0マイクログラムを、アンフィゲン（商品名）で助成したものによって免疫性を付与させた。第1回接種2週間後に補助接種を施して、1週間後にこの豚から採血した。豚炎病原体の全血をウエスタン法プロット分析して、この免疫血清が、3 6 K Dα抗原を特異的に認識することが認められた。これらの結果は、プラスミドP M Y C O S Oによって生産される3 6 K Dュタンパク質は、豚炎病原体3 6 K Dα抗原の粗挽え形複製体であることを指示するものである。

(実施例6) 粗挽え形3 6 K Dα抗原のウクチンとしての使用

プラスミドP M Y C O S Oのトライトン可溶分を前記同様に調製した。その可溶分は、粗挽え形の分子量3 6 K Dαの抗原が、全血の約6%を構成するところのタンパク質を、1 m g当たり1.0マイクログラム含むしたものである。0.36

6頭の供試豚割れグループに、7.3%の豚炎病原体の回復、3頭の試験グループには、3.8%の豚炎病原体の回復が認められた。

(実施例7) 豚炎病原体の7 4.5 K Dα抗原の上と下6塩基の、大腸菌内における張り

形質転換体M13MYC0102の構成

プラスミドP M Y C O S Iを分子量7 4.5 K Dαの抗原遺伝子（実施例3と第9図参照）の源泉として使用した。M13mp18RF DNA（ベセスタ研究所製）は、7 2 5 3塩基対ファジペクター（第16図）であって、これを酵湯HindIII（マンハイムのベーリングナー社製）とPstI（ベセスタ研究所製）で培養し、T4リガーゼ（ベーリングナー社製）を使用してHindIIIとPstIで培養したプラスミドP M Y C O S Iに作用させて、大腸菌JM103菌株に転換させた。その転換体の1種を変種M13MYC0102とし、これを種々の制限酵素で培養することによって、第17図の制限マップが求められた。

m gのトライトン可溶分と、4.15 m gのPBSと5.0 m lのフロイント不完全助成剤とが、各5ml万分に相当する乳化ワクチンを調製した。

ネブラスカ大学において、豚炎病原体から提供され、初めなしで飼育された仔豚を、屠場室に収容して、ワクチン供給ノ抗原は手試験を行なった。家豚のマイコプラズマ性肺炎（MPS）に対する予防用の、粗挽え形3 6 K Dα抗原を評価するための試験法規定は下記の通りである。

ワクチン接種と抗原投与試験規定

供試豚年齢	接種
3週齢	第1回接種、 <u>1 0 0</u> マイクログラムの粗挽え形 <u>3 6 K D</u> α抗原を、不完全フロイント助成剤混入で使用する。
6週齢	上記と同量頭を第2回接種
9週齢	<u>1 0⁶</u> CCIDの豚炎病原体株P-5772-1により抗原供与、気管内供与
10週齢	剖検、豚炎病原の検討

M13MYC0107の構成

分子量7 4.5 K Dα抗原遺伝子のDNA配列を基幹として、9 6塩基長さの合成オリゴヌクレオチド、即ち下記のCOD 639を転換して、2箇のアミノ酸を生成させるようにした。

COD 639

11

LEU-GLY-THR-THR-ASN-SER-VAL-VAL-ALA-ILE-ILE-GLD
CTT-GCA-ACA-ACA-AAC-TCA-GTT-GTC-GCA-ATT-ATT-GAA
-TGT-TCT-TTC-AGT-ACA-CAA-CGT-TAA-TAA-CTT

23

ASN-GLN-LYS-PRO-VAL-VAL-LEU-GLU-ASN-PHD-ASN-GLY
AAT-GAA-AAA-CCT-GTC-GTT-CTC-GAA-AAT-CCC-AAC-GGA
TTA-GTT-TTC-GGA-CCG-CAA-GAG-CTT-TT

即ち、「核酸研究報告」13の8749～8764頁および、同じく13の8764～8785に掲載のナーラー他による2種の方法に基づく突然変異法により、抗体のN-末端にある2個のアミノ酸に変化させるものである。このCOD 639に伴う突然変異によって、V 8 1（バリ

特開平2-291271 (20)

ン")をCys ("シスチン)に変化させて、Dde I部位を破壊させ、Val ("アルギニン)に変化させて、Tha I部位を新たに生成させる。これらの変化は、前記の大腸菌JMBのタンパク質内にあう予想された両性らせん性の2つの区段を再生させるものである。

「核酸研究報告」14の9679～9688頁(1986)のK. 中村とF. エクスタインの方法によって作成した、M13 MYCO102の単一鎖DNAを、M13 MYCO107と命名された粗細胞体培養物を生成するのに使用された。第16図の各ステップ中での結果として使用した。このDNAは調製後に、突然変異による変化的1つを検証するために、酵素Tha Iで増産した。予想通りに、第19図のM13 MYCO107は、長さ2kbの断片を0.4と1.6kbの2個の断片に変換させるTha I部位を追加して有するものである。M13 MYCO107のDNA配列を分析し、M13 MYCO102のそれと

比較することによって、これらの変化はいずれも確認され、COD639のいずれかにおいても70%培養液内には、何ら変化が起こらないことを示した。

プラスミドpMYCO116の構成

実施例3、第11図のプラスミドpMYCO32を精製し、これを酵素Pst I (ニューアイラングランドバイオラブス製)で培養し、作成の際の酵素フィラスファターゼ (CIP、ベーリングガー社製)で処理し、Pst I (酵素、プロメガバイオテクノロジー)とApa I (ニューヨーク、バイオラブス製)で培養し、及びCIPでフィラスファターゼ処理し、大腸菌JM109菌体に転換させた。その1種をプラスミドpMYCO116と命名し、そのDNAを精製しHind IIIで培養して、長さ2.2kbの挿入部位を検証した。精製した第20図のpMYCO116のDNAを、大腸菌のCY15000株の転換に使用した。精製したコロニーの1つを、100μg/mlのアンピシリンを含むL肉汁中で増殖させた。通常の遠心分

離で細胞を採取し、8%のレショ糖、0.5%のトライトンX-100、50mMのEDTA、10mMのTris pH8.3、および0.56mg/mℓの過卵白リゾチーム (HEL、シグマ社製)より成る混液中で、再懸滴させ、100℃まで短時間加熱した。上澄み液からのプラスミドDNAを、Hind IIIで培養し、正確の挿入を検証した。Tha IとDde Iの培養が、新しいTha I部位の存在と、0.26と0.76kbの2つの断片を单一の1.0kb断片に変換させるDde I部位の欠損とを検証した。

プラスミドpMYCO116生産物の発現

CY15000の細胞 (pMYCO116)を採取し、洗浄し、25mM Tris pH8.0の10mM EDTAと、0.5mg/mℓの過卵白リゾチームとの混液中で15分間超音波処理した。上澄み液(可溶分)の2マイクロリットルを、12%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動処理した。プラスミドpMYCO116が、可溶タンパク質の約10%を占める分子量74.5

kdのタンパク質を生成し、これはプラスミドpMYCO32によって生成されるものと同等の大ささである。

125mℓの培養液の可溶分を前記同様に調整し、分子量74.5kdの生成物を電気泳動によって精製した。31のアミノ酸残基分のアミノ酸配列を分析した結果により、操作されたタンパク質が確認され、バリンVal ("")がシスチンCys ("")に変換されることを裏付けるに足りる。しかしながらシスチンは、信号が通るためにタンパク質配列の分析では直接に検証することはできない。バリンVal ("")からアルギニンArg ("")への変換は、残基24においてバリンの代わりにアルギニンを検出することによって確認された。

(実施例4) ワクチンの成分として使用する熟のプラスミドpMYCO32生産物のワクチン精製の処方と投与

CY15000の細胞 (pMYCO116)を、14リットルのシェマップ培養器中の、リン酸ナトリウム緩衝化少量緩衝剤中で、8%外径

特開平2-291271 (21)

600の細胞密度となるまで培養させた。液体重量360gの細胞が、4.2リットルから採取された。100gの細胞を、12 mMのEDTAを含むする300mLのPBS中に懸濁させた。5~8,000 CPSI(ボンド/平方インチ)の供給圧で作動するメントシ・ゴーリン製ホモジナイザで、細胞外膜を壊壊させた。1リットルの収量に対して10モルまでのEDTAを添加することにより均質化を促進させた。均質化させた液体を成細胞液により透明化した。培養の50mLを、100mLの従流D E A Eカラムに供給し、試料およびカラムを、50 mMリン酸ナトリウムでpH 7.0とし、2 mMのEDTAを加えた液で平衡させ、結合しない部分は生成物として保持された。この試料を無菌封避させる。使用の直前に、100mg/mLのPBSを添加して乳化させてワクチンとして使用する。1回の投与量は、100mgの精製成分と等価である。

ワクチンとして使用する際のP M Y C O I S Sの量

のPBSを添加して乳化させ、ワクチンとして使用する。1回の投与量は、100mgの精製成分と等価である。

6頭のワクチンの処方を、6群の仔豚に投与するに規定した。下記ワクチンについて説明すると、「r74.5kDa」は、遺伝子組換え法によって形成した肺炎球菌体の74.5kDa抗原で、「r118」は、74.5kDaタンパク質から遺伝子的に操作した変種であり、その中では、2種のアミノ酸の変化、即ち前述の変化が74.5kDa抗原内で起されたものである。すべての組換え形74.5kDa抗原の処方には、少くとも純度95%の抗原を使用した。「アンフィゲン」とは、MRKスマーケティングサービスInc(ネブラスカ州エルクホーン)で開発された合成水性の免疫助成剤である。「アルヒドロゲル」は、3%水酸化アルミニウムである。「クイルA」は、樹木のキラヤサボテリアの樹皮から抽出して得られた、半精製グリコシドである。このグリコシドは、被膜タンパク質を結合さ

れることによる機能がある。ワクチンA、B、C、Dは、ノーザンラボラトリーズ社で測定され、100pmのメルチオレートを含有する。ワクチンEとFは、コドン社(南サンフランシスコ)で測定された。
大腸菌体CY15000(PMYC0116)を、リン酸ナトリウム緩衝液で洗浄した少量の媒剤中で、1.4リットルのシエマップホルダードで、80℃外温60℃の細胞密度となるまで培養させた。液体重量360gの細胞が、2リットルから採取された。100gの細胞を、12 mM EDTAと、5mL/mLの過剝白リゾチームを含む300mLのPBS中に懸濁させ、25℃で15分間然成させ、氷上で2分間、30秒間バーストして超音波処理し、回転加速度13,000gで10分間4°Cで遠心分離した。可溶部を保存した。ポリテタリルナミドゲル電気泳動法によると、分子量74.5kDaの抗原が、約10%の可溶部、即ち強解離液体1リットルに約2.5gの生成物を含むことが知られた。可溶部50mLを100mLの従流D E A Eカラムに供給し、試料およびカラムを、50 mMのリン酸ナトリウムでpH 7.0とし、2 mMのEDTAを加えた液で平衡させ、結合しない部分は生成物として保持された。使用の直前に、100mg/mLの

のPBSを添加して乳化させ、ワクチンとして使用する。1回の投与量は、100mgの精製成分と等価である。

ワクチンA、B、C、DとEは、1猪頭に2mLを背部の皮下に注射し、1頭1回当たり、100mgの量の抗原に相当した。補助注射は、臀部の側面に行った。

ワクチンFは、各鼻孔内に1.0mLの量を投与し、1頭1注射につき100mgの抗原に相当した。ワクチンの処方は下記のとおりである。

- A) PBS + アンフィゲン
- B) r74.5kDa + アルヒドロゲル (12重量%)
- C) r74.5kDa + リボゾーム/クイルA
- D) r74.5kDa + アンフィゲン (5%V/V)
- E) r118 + アンフィゲン (5%V/V)
- F) r74.5kDa + PBS

4頭の仔豚を7頭ずつの6群に分割した。A

特開平2-291271(22)

からFまでの6群の各々は、ワクチンA、B、C、D、E、Fの何れか1種を接種した。仔豚を各群に生後14日において剖当てた。この時点で全頭から3mlとずつ採血し、秤量し、ワクチンA、B、C、D、E、Fの何れか1種の2mlまで、各仔豚の割あてられた群に従って、ワクチンを作成した。

各仔豚は、生後3日目時ににおいて縫扎させ、35日齢において2回ワクチン接与した。第2回接与前に、全仔豚から3mlとずつ採血した。

42日前に連した時、前以て接種済みした独立頭は各仔豚を収納した。生後49日には、全仔豚がも採出し、秤量し、剖瘻病原体菌株数×572.2×3の10⁴CCUの2mlを気管内投射した。

生後63日と77日に再び採血、秤量し、1-4から2.3mg/kgのシリタールで不動状態とし、健強死させて除血させた。肺を取出して、肺炎の回復度を検定した。予備抗原接与時と接見時ににおける、各仔豚の体重増加データを集成し

た。剖瘻病原菌回復折数と体重増加データを、下記表1と2として各々集成した。

表1

肺部の恢復率(%)

A群: PBS + アンフィゲン使用

実験番号	回の病歴	斑点病歴	合計
1	16.2	14.7	40.9
2	5.0	10.8	16.5
3	10.4	6.5	14.9
4	2.0	38.9	41.7
5	7.2	25.5	32.7
6	8.4	0.0	8.4
7	5.2	0.0	5.2
平均値	11.6/-12.7	10.9/-18.0	21.5/-17.4

B群: r74.5KD-a抗原 + 助成剤アセト酸ナトリウム

実験番号	回の病歴	斑点病歴	合計
1	7.3	9.9	17.2
2	3.7	30.5	34.2
3	10.2	0.0	10.2
4	25.3	0.0	25.3
5	14.8	0.0	14.8
6	0.0	0.0	0.0
7	0.0	3.4	3.4
平均値	8.7/-9.1	6.3/-11.0	15.0/-12.0

C群: r74.5KD-a抗原 + 助成剤リジン-6/クイアル

実験番号	回の病歴	斑点病歴	合計
1	1.0	39.2	40.2
2	5.6	22.1	26.0
3	0.0	2.7	2.7
4	11.3	0.0	11.3
5	3.2	0.0	3.2
6	5.4	0.0	5.4
7	11.3	3.1	14.4
平均値	5.4/-4.6	9.6/-15.3	15.0/-14.2

D群: r74.5KD-a抗原 + 助成剤アンフィゲン

実験番号	回の病歴	斑点病歴	合計
1	11.3	18.7	50.0
2	0.7	11.2	11.9
3	21.0	14.1	35.1
4	0.6	14.3	14.9
5	19.3	14.4	27.7
6	1.1	9.7	10.9
7	18.1	7.2	25.3
平均値	9.5/-8.6	18.5/-11.7	28.0/-13.0

E群: E116 + アンフィゲン(助成剤)

実験番号	回の病歴	斑点病歴	合計
1	0.2	32.2	32.4
2	30.0	0.0	30.0
3	6.0	19.9	25.9
4	3.2	26.4	31.6
5	4.9	2.1	7.0
6	7.2	0.2	7.4
7	1.0	0.0	1.0
平均値	7.6/-10.2	10.1/-14.0	20.7/-12.7

F群: r74.5KD-a抗原 + PBS(気管内投与)

実験番号	回の病歴	斑点病歴	合計
1	4.0	18.0	22.0
2	3.0	0.0	3.0
3	0.0	0.0	0.0
4	2.7	0.0	2.7
5	6.1	0.0	6.1
6	8.4	0.0	8.4
7	3.6	0.0	3.6
平均値	3.8/-2.2	2.6/-6.0	6.4/-7.2

特開平2-291271 (23)

第 2 表

体重増加率、ワクチン投与から剖検まで			
A 群: PBS + 助成剤アンフィダン			
症査番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	38	64	26
2	39	72	33
3	21	43	22
4	28	56	28
5	34	63	31
6	23	60	37
7	33	64	31
平均値	37.6	-/-4.3	
B 群: T 74.5 kDa 抗原 + アルビドロゲル			
症査番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	39	69	30
2	40	74	34
3	24	54	30
4	22	48	26
5	28	52	24
6	29	48	19
7	17	71	54
平均値	28.4	-/-5.3	

C 群: T 74.5 kDa + 助成剤リゴ-ム/クイッカ			
D 群: T 74.5 kDa 抗原 + 助成剤アンフィダン			
症査番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	32	60	28
2	30	58	28
3	18	42	24
4	21	48	27
5	20	56	36
6	27	57	30
7	30	52	22
平均値	26.3	-/-2.8	
症査番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	40	79	39
2	41	70	29
3	15	32	17
4	24	53	29
5	38	68	30
6	33	60	26
7	33	72	39
平均値	31.1	-/-7.8	

E 群: T 74.5 kDa + アンフィダン			
症査番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	35	66	31
2	22	46	24
3	21	40	19
4	26	60	34
5	37	69	32
6	32	64	32
7	36	69	33
平均値	28.3	-/-5.6	
F 群: T 74.5 kDa 抗原 + PBS (腹腔内投与)			
症査番号	ワクチン予備投与時	剖検時	増加量
1	32	61	29
2	25	53	28
3	19	45	26
4	15	31	16
5	33	66	33
6	30	59	29
7	33	64	31
平均値	27.4	-/-5.7	

(実験例 9) T 74.5 kDa 抗原のアミノ酸配列 1 に対応する TGA コドンの突然変異

第 6 図は、分子量 74.5 kDa の抗原遺伝子の形質転換を示す。この 74.5 kDa 遺伝子の 211 位置におけるアミノ酸トリプトファンは、

TGA の暗号が付与されている。プラスミド pMYCO31 と pMYCO32 によって生成されるタンパク質を検討して分ったことは、TGA コドンは、trpT176 サンプレッサがない場合、大腸菌 (E. coli) 内のペプチド鎖の伸長を終止させることである。試験管内で突然変異によって、コドン TGA を TGG に変化させれば、trpT176 サンプレッサがなくても、211 位置におけるペプチド鎖の伸長を可能ならしめると想定した。

プラスミド pMYCO32 を、酵母 Hind III で培養し、74.5 kDa 抗原遺伝子を含む長さ 2.2 kb の断片を、T4 リガーゼを使用して、Hind III で培養されたベクター pUC9 に作用させて、大腸菌の JM109 国株に形質転換させた。その 1 種をプラスミド pMYCO56 と命名し、その制限マップは第 21 図のようになる。予想の通り、pMYCO56 は、74 kDa 抗原の早目に終止した断片を生成する。

第 16 図の M13mp18 RF DNA は、

特開平2-291271(24)

7253の癌細胞のファージベクターで、これを Hind IIIとPstIで培養し、T4リガーゼを使用して、Hind IIIとPstIで培養されたpMYC031に作用させて大腸菌のJM103菌株に転換された。転換体の1種のM13MYC0102(第17図)からのDNAを、種々の制限酵素で培養させて、第17図の制限マップが得られた。

74. 5kDa抗原遺伝子のDNA配列を基幹として、3名癌細胞の合成オリゴヌクレオチド、即ち下記のCOD638を、TGAを変化させることにより統計した。その方法は、「核酸研究報」13巻の8749～8764頁と8784～8786頁のデーター他の方法により、部位別同突然変異を利用する方法である。

204 TRP ASP ASN GLU ILE VAL ASN TRP LEU VAL
LYS LYS ILE LYS TGG GAT AAT GAA ATT GTA
AAT TGA CTT GTT AAA AAA ATC AAA CC CTA
TTA CTT TAA CAT TTG ACC GAA CAA TTT TTT
.T

pMYC056のDNAを酵素SphIで培養し、子牛の細胞内酵素のファスファターゼで処理し、T4リガーゼを使用して、SphIで培養されたM13MYC079に作用させて、大腸菌のCY15000菌株に転換させた。その1種をプラスミドpMYC057と命名し、その制限マップは、プラスミドpMYC056と同一と判明した。74. 5kDa抗原と同様に、プラスミドpMYC087で、211位置におけるペプチド鎖の伸長は可能となり、約74kDaのタンパク質が生成される。

pMYC087のアンビシリン耐性をテトラサイクリン耐性に変換させるために、pMYC087のDNAを酵素ApaIIとEcoR Iによって培養し、リガーゼT4を使用して、テトラサイクリン耐性クローニングベクターpBR322の2.5kbのApaIIとEcoR Iの断片に作用させて、大腸菌のMH1菌株に形質転換させた。

転換体の1種をプラスミドpMYC091

「核酸研究報」の第14巻、9679～9698頁(1986)記載のK. 中前とP. エクスターインの方法によって調製したM13MYC0102の小鼠DNAを、第18図の各ステップにおける動型として使用した。但し、オリゴヌクレオチドのCOD638が、1箇所だけ突然変異を含むという点で異っている。

4個の宿主細胞を選び、それらのDNAを取出し、DNA配列を分析した結果、いずれの宿主細胞も所要のTGAからTGGへの変異が成されたであることが判った。TGAコドンと同様に、このTGGコドンは、トリプトファンに対して暗号付ける。但しTGAと異なる点は、TGGは、大腸菌によって終止コドンとは認識されない点である。4個の宿主細胞のすべてからのRF DNAをプールしてM13MYC079と命名し、その制限マップは、M13MYC0102と同様であることがわかった。

通常の74. 5kDa抗原遺伝子を、TGGコドンの複数体に書きかえるためには、プラスミド

(第22図)と命名し、そのDNAを種々の制限酵素で培養して、図示のマップを得た。予想どおり、このpMYC091は、約74kDaのタンパク質を生成する。このpMYC091の機能区画は、第23図中に表示されている。

なお、プラスミドpMYC087とpMYC091は、共に、TGAサンプレッサがない状態で、74. 5kDaの抗原に対して暗号付けをする。

(実施例10) 脊髄腫瘍細胞の41. kDa抗原分子量41. kDa抗原に対する遺伝子の特定

さきに実施例1に記載したラムダ5-5-59から引出された再分離細胞のDNA配列の分析によれば、長さ6. 8kbの断片は、仮想的なマイコプラズマタンパク質41.に相当する聞いた読み取り枠を有することが示された。この予知されたアミノ酸配列は、大腸菌のDNAJ菌株のものと58%まで同一であった。このDNAJと41.との各配列の一部分の比較は下記のとおりである。

特開平2-291271 (25)

dnaJ (配列) : 'Met Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile Leu
 41" (配列) : met ala lys gln asp phe tyr lys tyr lys
 dnaJ (配列) : "'Gly Val Ser Lys Thr Ala Glu Glu Arg Glu
 41" (配列) : gly val glu lys ser ala ser leu thr glu
 dnaJ (配列) : "Ile Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Leu Ala Met
 41" (配列) : ile lys lys ala tyr arg asn leu val asn
 dnaJ (配列) : "'Lys Tyr Ile Pro Asp Arg Asn Gln Gly Asp
 41" (配列) : ile tyr his pro asp lys asn thr lys lys

この41" 内でのアミノ酸配列は、その50%以上が dnaJ のアミノ酸配列と同一であると共に、4-1" 抗原が dnaJ の同族体であることが、下記の事実から支持された。即ち(1) 大腸菌 dnaJ の遺伝子は、大腸菌 dnaK の遺伝子からの流れをくむものであること。(2) 大腸菌の株 dnaK と dnaJ との間には、AAUUA ループを持った 16 対の塩基対基盤を形成する潜在力を有する逆位反復部が存在すること。この 2

288 と 4457 との間にある) を精製し、T4リガーゼを使用して BamH I と SmaI で接着されたベクター pUC9 に作用させて、大腸菌株 JM83 に転換させた。その 1 種をプラスミド pMYC074 と命名し、その DNA を調製し、且 IndI で培養し、165番目の塩基対 HindIII - HindIII の断片を精製し、T4リガーゼを使用して、HindIII で培養された pMYC073 に作用させて、大腸菌株 JM83 に転換させた。その 1 種をプラスミド pMYC080 と命名し、その制限マップは第 26 図である。

この pMYC080 からの DNA を大腸菌株 C Y15000 に転換させた。いくつかの転換体を選択してし肉汁中 37℃ で、外径 OD₅₅₀ = 2 となるまで成長させ、遠心分離により細胞を採取した。細胞を、媒質成分による汚染を除くために M 9 級衝液に再懸濁させて洗浄し、及び遠心法で分離採取した。得られた細胞ペレットを、0.5 mg/mg の酶白色リゾチームを 25 mM Tris pH 8.0 の 10 mM EDTA に溶解し

種の構造は、いずれも脳炎病原体内に保有されている。

プラスミド pMYC080 の開発

第 1-1 図、第 25 図のプラスミド pMYC032 を、分子量 41" kDa 抗原遺伝子の源泉として、種々の発現プラスミドの開発に使用した。

T4: 6 kDa と 41" の抗原遺伝子は、プラスミド pMYC032 中に含まれている。T4, 5 kDa 抗原の遺伝子を除去するために、pMYC032 を調製して酵母 S. cerevisiae で培養し、T4リガーゼをと作用させて、大腸菌株 JM83 に形質変換させた。その内の 1 種を pMYC073 と命名し、その DNA を取出して、種々の制限酵素で処理して、第 24 図の制限マップを得た。DNA 配列を分析して、プラスミド pMYC073 は、41" 抗原の場合にはそのアミノ酸終端を符号付けしている抗原遺伝子の部分が欠失していることが分かった。この欠失部を補うために、pMYC032 を酵母 S. cerevisiae と E. coli で培養し、188番目の塩基対断片 (第 25 図) で、組成対の

た液中に、始めの培養体積の 1/5 分の 1 において再懸濁させ、25℃ で 10 分間熟成させ、4℃ 15 分間超音波処理した。得られた全溶菌液を遠心加速度 13,000 g で 10 分間 4℃ において遠心分離し、その上澄み液を可溶性タンパク質分として保存した。沈殿は、20 mM Tris pH 8.0 の EDTA と 2% ドライトン X-100 より成る浴液中で 2 時間溶解させた。分離して得られた各部分を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分別し、クーマジ青でタンパク質着色試験を行った。新たに、41 kDa のタンパク質が、宿菌液およびプラスミド pMYC080 のドライトン可溶化分離中に確認された。クエスター法プロット分析により、このタンパク質は、固位期の家族の血清と反応することが示された。

(実施例 1-1) 脳炎病原体の 96 kDa 抗原

分子量 96 kDa 抗原の部分的アミノ酸配列について、下記のオリゴヌクレオチド版 (C0D829 および C0D830) を合成した。

特開平2-291271 (26)

96 kDa ミノ酸配列の一節分

C O D 8 2 9

Ala-Asp-Glu-Lys-Thr-Ser-Xxx-Gln-Lys-Asp-Pro-Ser

G C X G A T G A A A A C X A G
C G G T C

C O D 8 3 0

Thr-Leu-Arg-Ala-Ile-Asp-Phe-Gln-Tyr-Asp-Glu-Asn-Thr

A T A G A T T T G A A T A T G A
T C C G G C
C

筋炎病原体遺伝子DNAを、制限酵素で培養し、アロガースゲル電気泳動で分子量の速に応じて分離させ、サザン法プロット分析を行った。C O D 8 2 9, C O D 8 3 0 は共に、大きさ 1 4 0 0 塩基対(長さ 1.4 kb)の H i n d I I I 制限断片、および 3.300 塩基対(3.3 kb)の E c o R I 制限断片に異種結合していることが認められた。

筋炎病原体遺伝子DNAを、H i n d I I I で培養し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分別し、約 1.4 kb 長さの断片を電気的に複数さ

せ、H i n d I I I では既にベクター p U C 9 に作成させて、大きさ選択用の遺伝子ライブラリーを作成した。96 kDa の抗原に対するクローニングを足りるためには、複数個のタイプライターコードからプラスミドDNAを調製し、H i n d I I I で培養し、ニトロセルロース中に移行させて、サザン法プロット分析に供し、C O D 8 3 0 によってプローブした。2種のクローニング(分離増殖体) p M Y C O 9 2 (第27回)と p M Y C O 9 4 は、C O D 8 3 0 に異種結合する 1.4 kb の H i n d I I I 増殖部位を含むものであった。

この p M Y C O 9 2 の増殖部位のDNA配列を分析して、(1)それが、C O D 8 2 9 と C O D 8 3 0 と類似の区域を有すること、および(2)すべてのアミノ酸が、その1種を除き、下記に示す 96 kDa 抗原に対して決定されるアミノ酸配列に適合するDNA配列から予見できることが判明した。

タンパク質 1
) Ala Asp Glu Lys Thr Ser Xxx Gln Lys Asp
配列

クローン 195
) Ala Asp Glu Lys Thr Ser Ser Gln Lys Asp
配列

タンパク質 11
) Pro Ser Thr Leu Arg Ala Ile Asp Phe Gln
配列

クローン 105
) Pro Ser Thr Leu Arg Ala Ile Pro Phe Gln
配列

タンパク質 21
) Tyr Asp Glu Asn Thr
配列

クローン 215
) Tyr Asp Leu Asn Thr
配列

さらにアミノ酸配列を再分析した結果では、明確に特定されていないアミノ酸による不適合が考えられる。96 kDa の抗原に対して決められたアミノ酸配列は、内部のクローニング配列に合致しており、分析とも矛盾しない結果が、タンパク質分解電気泳動によって引出される断片についても通用できることが分った。2種のクローニングの p M Y C O 9 2 と p M Y C O 9 4 を制限酵素で分析すると、

それらの挿入部位が、一見同一であるが、p U C 9 ベクターに対して、互いに反対向きであることが判明した。

p M Y C O 9 2 は、C O D 8 2 9, C O D 8 3 0 の何れかに対しても異種結合する予期の大きさの挿入部を有すると共に、96 kDa の抗原のアミノ酸配列に適合するようなDNA配列を有するので、長さ 1.4 kb H i n d I I I の挿入部が、3.3 kb の E c o R I 断片をクローニングするためのプローブとして利用できる可能性があった。筋炎病原体DNAを、E c o R I で部分的に培養し、指紋的アロガース勾配分析法によって分子量に応じて分別し、ラベルされた 15,000 から 18,000 对の塩基対断片を、バクテリオファージラムダベクター(ラムダダッジ) p M Y C O 9 2 にクローニングさせ、ランダムに挿入されたDNAラベリングキット(ペーリンガー社製)を使用して、放射性によるラベル付けを行い、約 500 個の粗接着体菌斑の中から、5 個の、p M Y C O 9 2 に異種交配された菌斑が判別さ

特開平2-291271(27)

れた。

DNAは、5種のファージから剪製され、Eco RIで培養され、ゲル電気泳動法によって分析されて、各菌斑块は、前述の断片（他の断片の他に）を含むものであった。DNAを、MYCOSと命名した他の粗染色体から剪製し、制限酵素によって培養し、得られた制限マップは第29図である。

長さ3.3kbのEco RI断片をサブクローンさせるために、ラムダMYCOSを、Eco RIで培養し、Eco RIでは培養したベクターPU C8に作用させて、大腸菌K12のJM83菌株に転換させた。3.3kb長さのEco RI断片を含む2種の細胞体pMYC095とpMYC096を分離し、それらのDNAを剪製し、制限酵素分析を行ったところ、それらの挿入部は、一見同一であるが、その方向は、PU C8ベクターに対し正反対であった。このpMYC095の制限マップは第29図のとおりである。長さ1.4kbのHind III断片のDNA配列分析と、ラム

ダMYCOSの制限マップデータによれば、3.3kb長さのEco RI断片は、分子量96kDaの抗原遺伝子の全体を含んではいないことが分かった。

ラムダMYCOSの制限分析によれば、2.2kbのEco RI断片は、3.3kbのEco RI断片の近傍にあり、その位置が正しいとすれば、これら2種の断片は、96kDaの抗原遺伝子全体を含む程十分に長い。この区域をサブクローンするために、ラムダMYCOSを、Bam HIとSal Iで培養し、Bam HIとSal Iで培養されたpWHA148に作用させて、大腸菌K12のJM83株に転換させた。その1種を第30図のpMYC0118と命名し、これは、予期された長さ(3.0kb)のBam HI-Sal Iの断片を含むものである。このDNAを剪製し、種々の制限酵素で培養して、第30図の制限マップが得られた。

長さ3.3および2.2kbのEco RI断片の遺伝情報的位置が、MYCOS内と同一である

ことを示すために、肺炎病原体をサザン法プロト分析に供した。pMYC0118の3.0kbのBam HI-Sal I断片（何れもEco RI断片を含む）か、pMYC095の長さ0.9kbのEco RI-Hind III断片（長い方の断片のみを含む）によって認識されるところの、肺炎病原体の長さ20kbのHind III断片に異種接着されていることが分った。この3.3および2.2kbのEco RI断片が、MYCOS中に存在する断片と異なるとすれば、pMYC0118の長さ3.0kbのBam HI-Sal Iの断片が、他のHind III断片に異種接着されている可能性は十分に予測される。

前記のpMYC0118を、酵素Bam HIとSal Iで培養し、Bam HIとSal Iで培養されたpMYC095（これは、ベクターに関して反対方向である点以外はpMYC095と同一である）に、リガーゼを使用して作用させて、大腸菌K12のJM83菌株に転換させた。その1種をpMYC0119と命名し、そのDNAを剪

製し、種々の制限酵素で培養することにより、第31図の制限マップを作成した。96kDaの抗原遺伝子の大体の位置が記入されている。

プラスミドpMYC0119は、前記実施例1に記載の方法により、大腸菌(E. coli)の菌株CY15000に転換され、96kDaの肺炎病原体抗原のエピトープを認識する抗体を発現させる機能のある1種のタンパク質を発現することができる。

以上、この発明の、特にワクチンを生成するために発現されるタンパク質の使用に関して説明したが、発現される種々のタンパク質は、肺炎マイコバクテリア病原体の抗体を判別するための診断用としても使用できる。さらに、発現されるタンパク質は、抗体を誘発させるために使用できると共に、誘発された抗体をワクチンとして使用することも可能である。

この発明は前記各々の実施例の他に、さらに多くの変形および改良が可能であり、これらもこの発明の特許請求の範囲に属することは勿論であ

特開平2-291271 (28)

る。

(発明の効果)

この発明による組成物中の異常遺傳子、例えば肺炎球菌体の抗原は、病原体抗原のエピトープを認識する抗体を誘起させる機能のあるタンパク質を発現させることができる。

またこの発明によれば、適切なプラスミドを使用して大腸菌等を形質転換すれば、病原体抗原を発現させ、これを利用して病原の予防接種用に応用することが可能となる。

4. 図面の簡単な説明

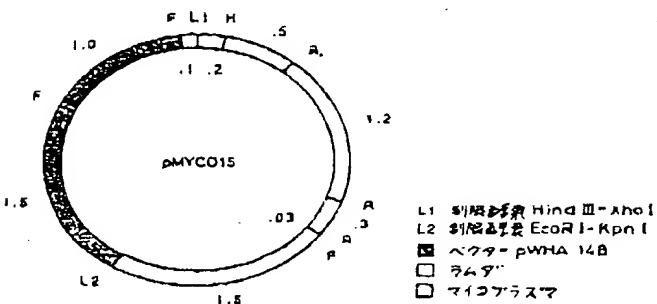
第1図は、この発明による形質転換体 pMYC01 の制限マップ、第2図は、転換体 pMYC04 の制限マップ、第3図は、転換体 pMYC015 の制限マップ、第4図は、転換体 pMYC08 の制限マップ、第5図は、転換体 pMYC016 の制限マップ、第6図は、7.4.5 kDa 遺伝子の形質転換を示す図、第7図は、B-ガラクトシダーゼのアミノ酸端末配列図、第8図は、プラスミド pMYC029 の制限マップ、第9図は、ブ

ラスミド pMYC031 の制限マップ、第10図は、プラスミド pCAM101 の制限マップ、第11図は、プラスミド pMYC032 の制限マップ、第12図は、形質転換体 pMYC039 の制限マップ、第13図は、形質転換体 pMYC040 の制限マップ、第14図は、41 kDa 遺伝子の翻訳を示す配列図、第15図は、転換体 pMYC050 の制限マップ、第16図は、ベクター M13mp18 の制限マップ、第17図は、転換体 M13MYC0102 の制限マップ、第18図は、M13MYC0102 から翻訳するステップを示す説明図、第19図は、転換体 M13MYC0107 の制限マップ、第20図は、転換体 pMYC0116 の制限マップ、第21図は、転換体 pMYC056 の制限マップ、第22図は、転換体 pMYC091 の制限マップ、第23図は、転換体 pMYC091 の他の実施例の制限マップ、第24図は、転換体 pMYC073 の制限マップ、第25図は、プラスミド pMYC032 の制限マップ、第26図は、プラスミ

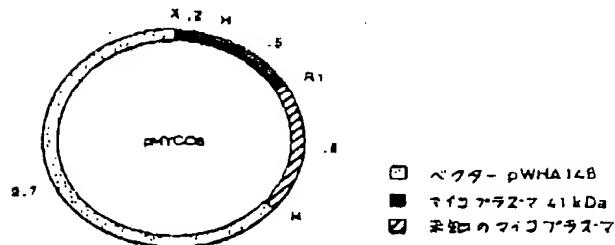
ド pMYC080 4.639 bp の制限マップ、第27図は、プラスミド pMYC092 の制限マップ、第28図は、ファージから剪断された DNA の制限マップ、第29図は、λ MYC05 からの転換体 pMYC095 の制限マップ、第30図は、λ MYC05 からの転換体 pMYC0118 の制限マップ、第31図は、pMYC0118 からの転換体 pMYC0119 の制限マップ、第32図は、分子量 3.6 kDa の DNA の制限マップ、第33図は、分子量 4.1 " kDa の遺伝子の翻訳説明図、第34図は、分子量 9.5. 6 kDa の DNA の制限マップである。

(以下の各々は制限酵素を表わす) H---Hind III, R, R1---EcoRI, X---XbaI, F---FspI, A---AccI, A, A---AsuII, C---CbaI, B---BglII, P---PstI, Pf---PflMI, Af---AflII, S---SstI, Rv---EcoRV, T---ThaI.

第3図

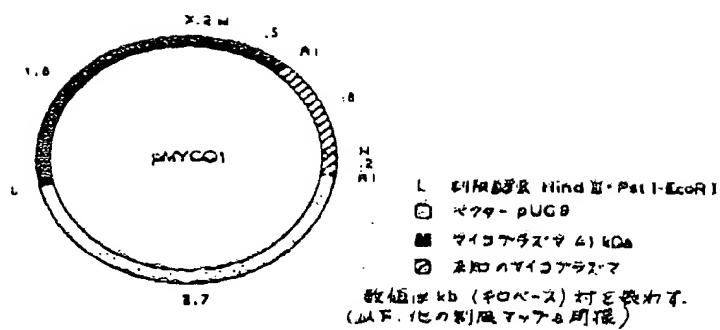


第4図

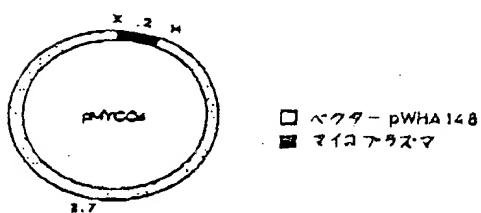


特開平2-291271 (29)

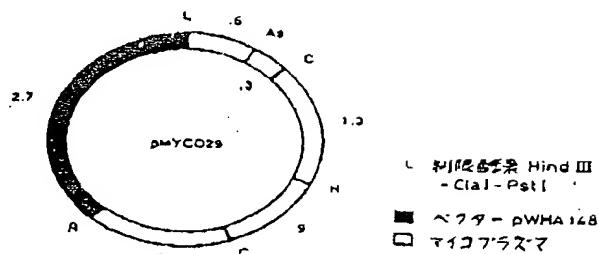
第 1 図



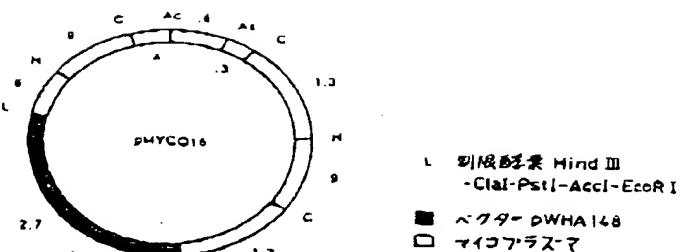
第 2 図



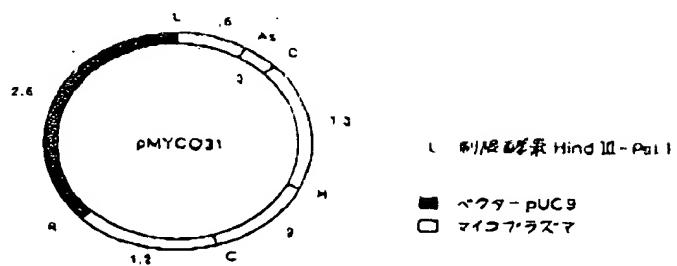
第 8 図



第 5 図



第 9 図



354平2-291271 (30)

第6回 -1

第6回 -1

TTA GAA TTA TCC GGT GGA ACC TTC GAA GTC GAT TTA TCA ACA AGT GGT
 200
 ASP ASN HIS Ile GLY GLY ASP ASP LTP ASP ASN GLU Ile Val 210
 GAT AAT CTT TTA GCT GGG GAT GAC TGG GAT ATT GAA ATT GCA ATT
 LTP Leu Val Lys Ile Lys Glu Val Lys ASP Phe ASP Pro Lys 220
 TGA CTT GCT AAA ATC AAA ATC AAA GCA GTC ATT GAT ATT GAT CCA AAA
 Ser ASP Lys Met Ala Leu Thr Arg Leu Lys Glu Glu Ile 240
 AGT GAT AAA ATG GCG CTT ACA AGA CTC ATT AAA GAA GAG GCT GAA AAA
 Thr Lys Ile Asn Leu Ser ASN Glu Ile Val Ser Thr Val Ser Leu 250
 ACC AAA ATT AAT CTT TCA AAA CAA AGT GCT FCT ACA GTC TCT CTA
 Pro Phe Leu GLy Met GLy Lys ASN GLy Pro Ile ASN Val 270
 CCA TTT TTA GGA ATG GGC AAA ATC GGG CCG ATT AAC GTC ATT GAA CTT
 Glu Leu Lys Arg Ser Glu Phe Glu Lys Met Thr Ala His Leu Ile 280
 GAA CTT AAA AGA TCA GAA ATT GAA ATG ACT GGC CAI ATT ATC
 ASP ARG Lys Pro Ile Val ASP Ala Leu Lys Glu Ala Ile 300
 GAT AGA ACT CGC AAA CCA ATT GTT GAT GCT CTC AAA CAA GCA AAA
 Ile Glu Ala Ser ASP Leu ASP Glu Val Leu Val GLy GLy Ser 310
 ATT GAG GCT TCA GAT CTC ATT GAT GAA GCT CTC ATT GCA ATT GCA TCA
 Thr Arg Met Pro Ala Val Glu Ser Met Ile Glu His Thr Leu Ile 330
 ACA AGA ATG CCA CCT GCT GTC ATG ATT SAG CAT ACT ATT ATT
 Lys Lys Pro ASN Arg Ser Ile ASN Pro ASP Glu Val Val Ala Ile 340
 AAA AAG CCA AAT CGT TCA ATT ATT CCT GAT GAG GTC GCA ATT
 GLy Ala Ala Ile Glu GLy GLy Val Leu Ala GLy Glu Ile Ser ASP 360
 GGT GCT GCA ATT CAA GGG GGG GTC ATT CTC ATT GCA GAC ATC AGT GAT
 Val Leu Leu Val Val Thr Pro Leu Thr Leu GLy Ile Glu Thr 370
 GTC CTC ATT TTA GAT GAT ACT CCT TTA ACT TTA GCA ATT GAA ACT
 Leu GLy GLy Ile Ala Val Pro Leu Ile Pro Arg ASN Thr Thr Ile 390
 TTA GGT GCA ATT GCA ACA CCT TTC ATT CCA AGA ATT ACA ACA ATT
 Pro Val Thr Lys Ser Glu Ile Phe Ser Thr Ala GLU ASP ASN GLN 400

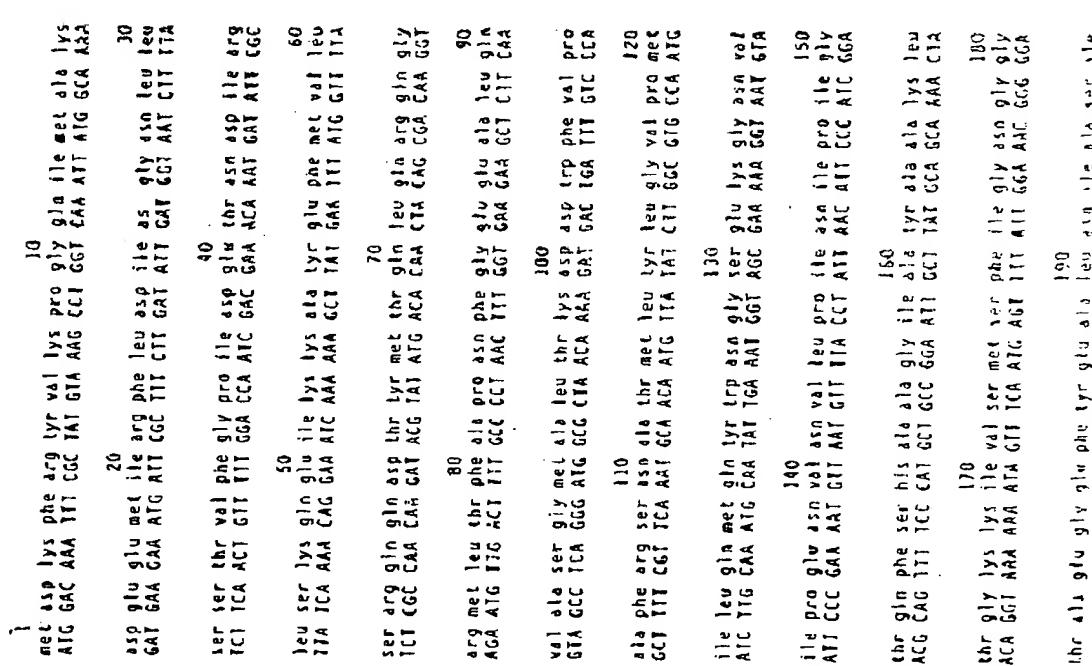
2-291271 (31)

FIG - 3

FIG

CCG GAA ACA AAG TCA GAA ATT TCC TCA AGC GCT GAG GAT ATT CAA
 410
 Thr glu val thr ile ser val glu ser glu arg glu leu ala
 ACC GAA GAA AGC ATT TCT GTC GTC CAA GGG GAA CGT CAA ATT GCA
 420
 430
 Ala ASP ASN Iys Met Leu Glu Arg Phe Asn Leu Ser Glu Arg Glu Ile
 GCG GAT ATT AAA ATG TAA AGC TGA GGT TTA ATT TAA TCA GGA ATT GAA
 440
 450
 Ala Ala Pro Arg Glu Leu Pro Glu Ile Glu Val Ile Phe Ser Ile
 CCT GCT CCC CGA GGT CCT CCC CAG ATT GAA ATT AGT ATT TCA ATT
 460
 470
 ASP Val ASN Glu Ile Thr Thr Val Ser Asp Lys ASP Lys Ile
 GAT GTC AAC GGG ATT ACA AGC GTC ATT TCA GCA ATT GAA ATT AAA ACC
 480
 Glu Lys Glu Glu Thr Ile Thr Ile Lys ASN Thr Ser Thr Leu Ser
 GTC AAA GAA CAA ACA ATT ACA ATT GAA ATT ACT TCA ATT TCA ATT
 490
 Glu Glu Ile ASN Lys Asn Ile Glu Glu Glu ASN Arg
 GAA GAA ATT ATT AAC AGG ATT TGG GAA GCA ATT GAA ATT CGT
 500
 Glu Glu ASP Ala Leu Lys Lys ASP Lys Ile Glu Thr Thr Val Arg
 GAA GCT GAT GCT ATT AAC GAC AAC ATT GCA ACA ATT GTC ATT CGT
 510
 520
 ARG PRO GLY ALA ARG ASP LEU GLY PRO ASP ARG CYS
 AGG CCT CGC CGG CGA GAT CTC GGC CCC GAT CGA TGC
 TCC GGA CGG CGC GCT CTA GAG CCC GGG CTA GCT ACG
 530
 540
 Glu Glu Ile ASN Pro Lys Glu Lys Glu Leu Lys Glu ASN
 GGT GAA AAC ATT GCA TCA AAC CAM AAC GAA ATT GCA ATT GAA AAC GAA
 550
 Glu Glu Leu Lys ASP Leu Leu Lys Glu ASP Lys Thr ASP Glu
 ATT CAA GAA ATT AAA ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT ATT
 560
 Leu Lys Leu Lys Glu Ile Glu Ala Ala Glu Ser Glu Ser
 TCA AAC TTA AAA TTA GAC GAA ATT GAA GCA GCT GCA ATT GCA ATT
 570
 Glu Glu Ala Thr Asp Glu Glu Ile Glu Ala Ala Glu Ser Glu Ser
 GTC GCA AGC AGC GCG CAG CGG GCA ATT ACA ATT GCA ATT GCA ATT
 580
 XhoI HindIII PUC18
 590
 Lys Ala ASP ASP Ser ASN Thr Ile Glu Ser Glu Ser ASP Pro
 AAA GCT GAT GAT TCA AAC AAC ATT GAT GCT GAA ATC AAC TGG GAT
 600
 Q.E.D.

特開平2-291271 (32)



- 542 -

16.OCT.2000, 16:29

PHILLIPS ORMONDE 96141867

NO. 0941 34/44

特開平2-291271 (33)

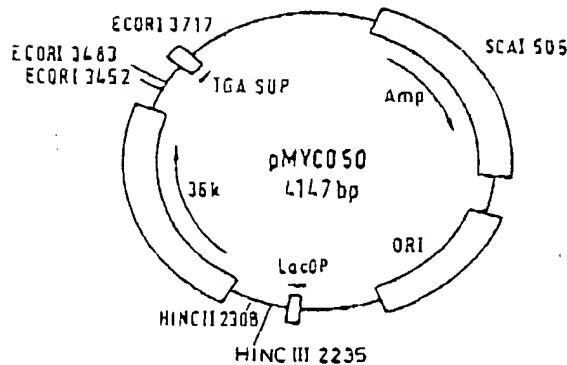
図面の序文

第 14 図 - 2

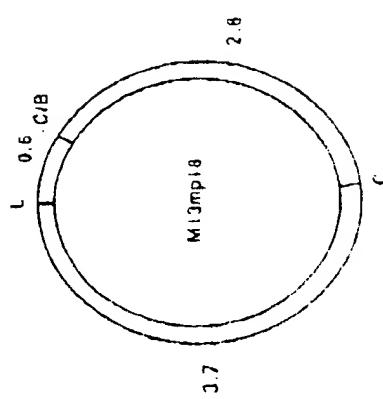
ACT GCC CAN GGC GAG TTT TAC GAA GCG CTA KAT ATT GCA AGT ATT
 200
 TGA AAA TGA CCA GTC GTC TTT TGC GTA ATT AAT GAA TGA GCA GCA
 ile ser thr pro asn lys tyr glu asn gly ala ser thr ile ala
 ATT TCA ACC CCA ATT AAA TAT GAA AAC GGT TCC TCA ACA ATT GCT
 210
 ala lys ala met ala ala gly ile pro gly ile arg val asp gly
 GCA AAA GCA ATG GCA GGC GCA ATT CCT GGC ATT CGT GCA GAC EGG
 220
 asp asp leu leu ala ser tyr glu val ile lys glu ala val asp
 ATT GAC CTT TTA GCT TCT TAT GCA ATC ATC GAA GCT GCT GTC GAT
 230
 tyr ala arg ser GAT ASN GLY PRO VAL ILE VAL GLU PHE VAL THR
 TAT GCT TGT TCT TGT TGT AAC GGC EGG
 240
 leu arg gln gly val his thr ser ser asp asp pro arg ile tyr
 TGA CCG CAA GGT GTC TAT ACC TCT TCT GAT ATT CCA CGA ATT TAT
 250
 arg thr val glu gln glu lys glu his gla lys lys glu pro met
 CGT ACT GTC GAA GAG GAA AAC GAA CAC GAA AAC TGA GAA CCA TGT
 260
 his arg ile glu lys tyr met phe asp arg gly phe ile asp ser
 CAC CGG ATT GAA AAA TAT ATG ATT GAC CGC CGA ATT ATT GAT TCT
 270
 thr asp ser gln pro asn leu arg trp ser ala cys asp cys Gln
 ACC GAT AGT CAA TCT ATT TIG AGA TGA AGC GCT TGC GAT TGT CAA
 280
 arg asn leu trp lys ile ser lys trp ala pro val asn asn trp
 TGA AAC TTA TGA AAA ATC TCT TGT TGG GCT TGA GTC GTC AAC AA! TGA
 290
 trp asn phe arg ser tyr leu gln gly phe thr thr arg thr trp
 TGA ATT ATT CGA TCA TAC CTA CAA GGT ATT ACC ACC AGC ATT TGA
 300
 arg thr lys thr arg ser ala trp ile phe QC
 KGG AGA AGA AGA AGC GCG TGA ATT ATT GAA
 310
 trans. dated Nov. Weight : 92157.94

図面の序文

第 15 図



第 16 図

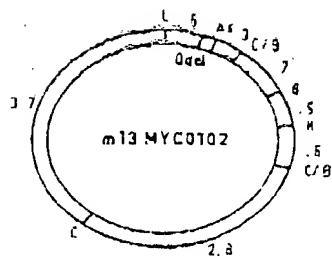


特開平2-291271 (34)

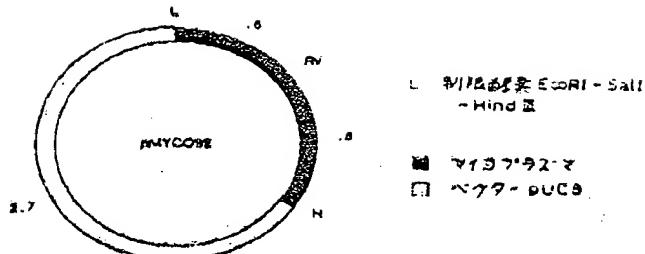
第 27 回

図面の構成

• 17 •



ベクター H13mp 18
 アラスミド RMYCO 31



第 28 四

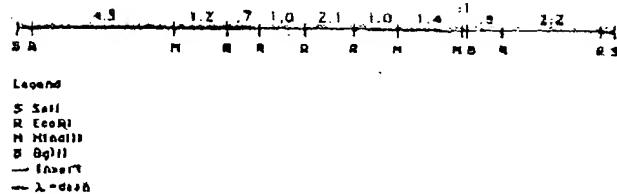
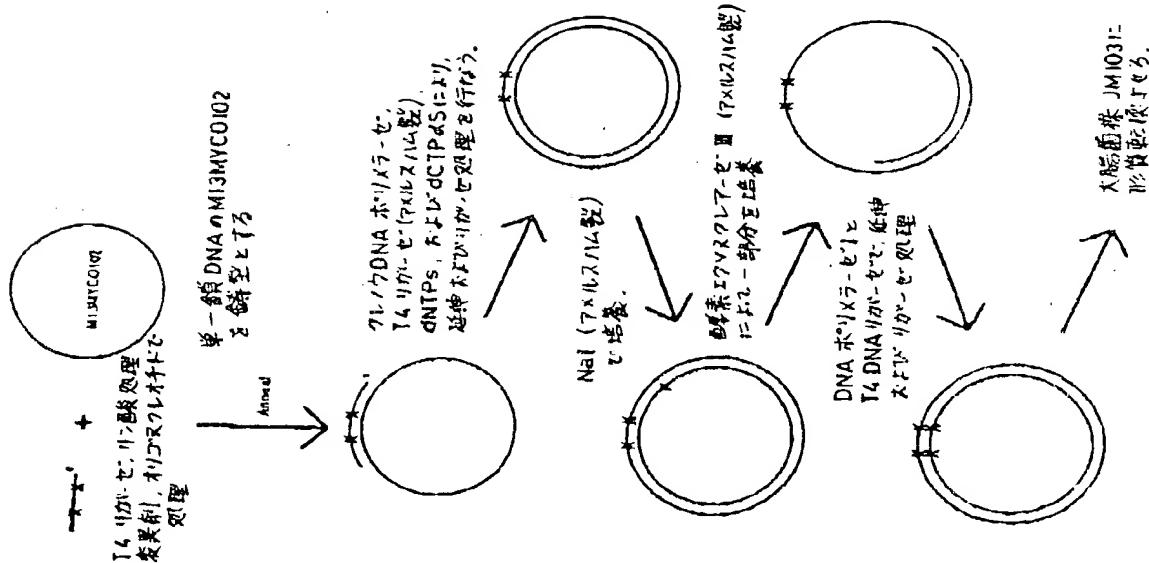
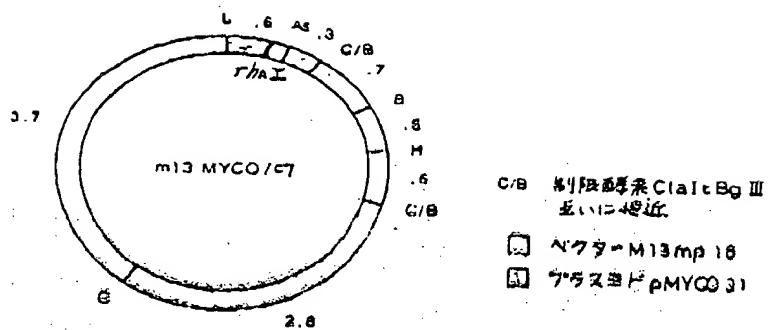


圖 18

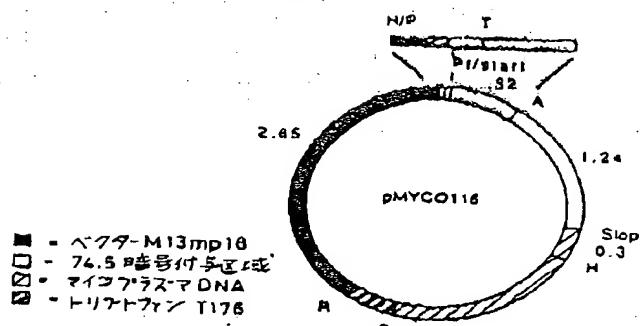


特開平2-291271(35)

第19図

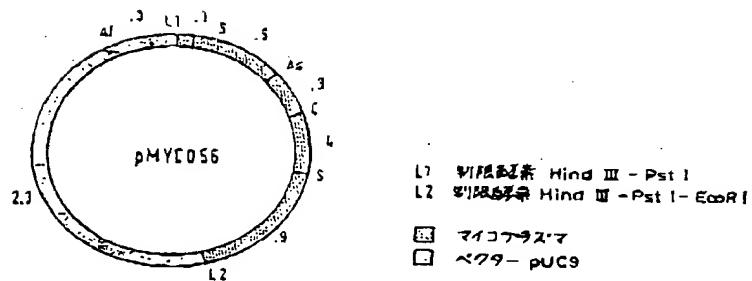


第20図

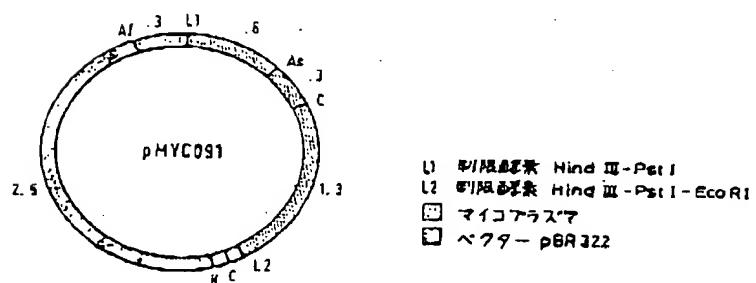


図面の添書

第21図

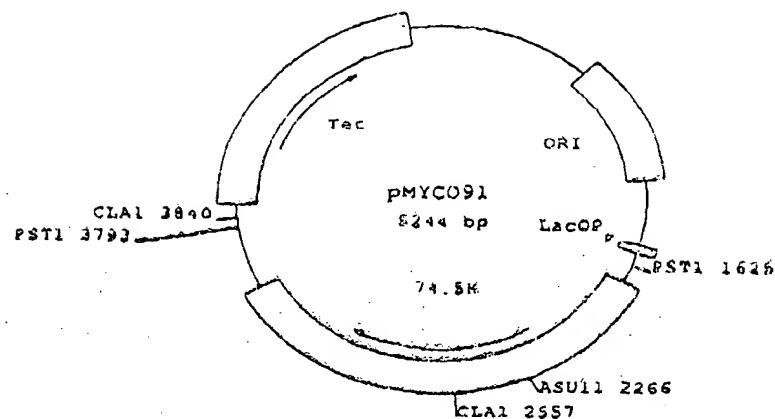


第22図

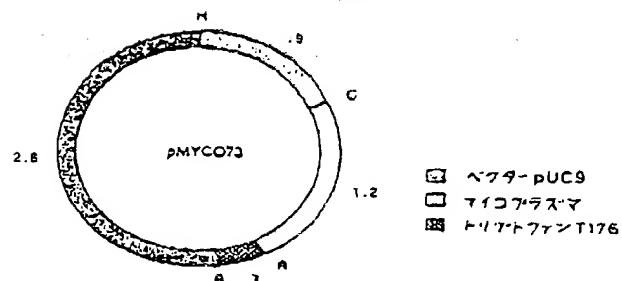


特質平2-291271 (36)

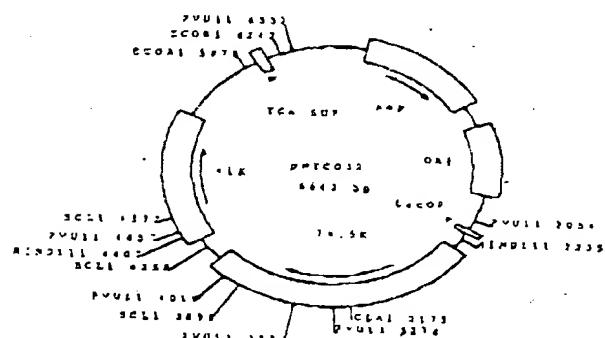
第 23 図



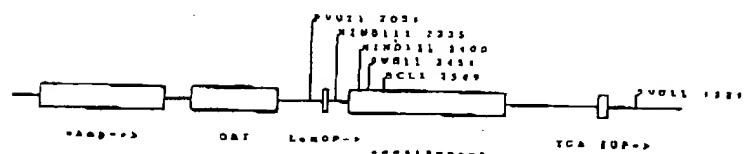
第 24 四



第 25 圖

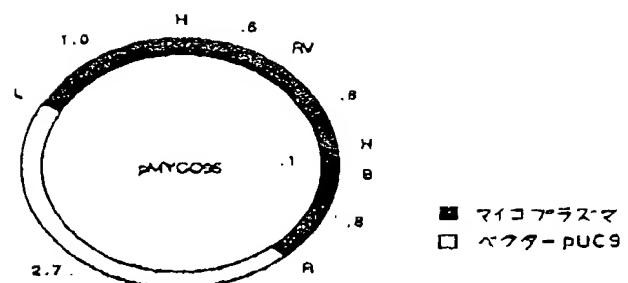


第 26 図

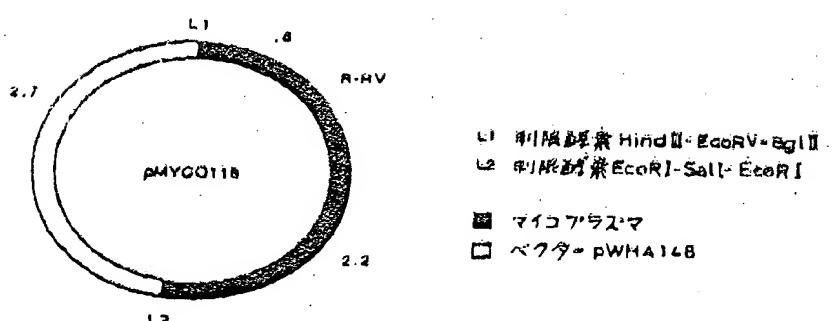


特印平 2-291271 (37)

第 29 図



第 30 号



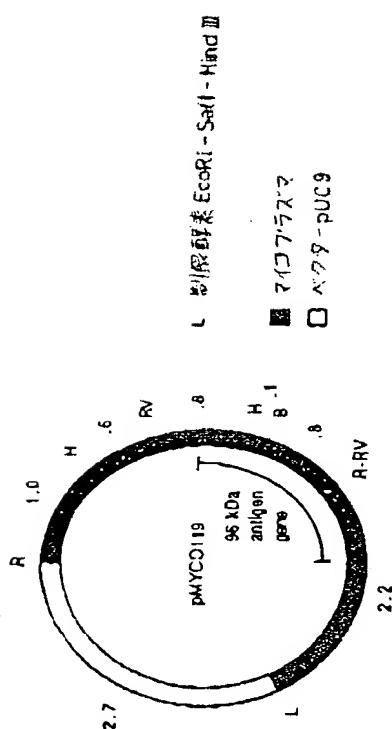
凶画の発見

第 33 四

TRANSLATION OF 31st GENE SEQUENCE OBTAINED TO DATE

10
 Met Ala Lys Glu Asp Phe Tyr Lys Ile Leu Gly Val Glu Lys Ser
 ATG GCA AAA CAA GAT TTT TAT AAA ATT CTG GGA GTT GAA AAA TCA
 20
 Ala Ser Ile Cys Glu Ile Lys Lys Ala Tyr Arg Asn Leu Val Asn
 GCA TCA CTA ACA GAA ATA AAA AAA GCT TAT CGA AAT TTA GTC AAC
 30
 Ile Tyr His Pro Asp Lys Asn Cys Ile Tyr Ser Ala Glu Glu Glu
 ATT TAT CAT CCT GAT AAA AAT ACA AAA AAC TCA GCT GAA GAA CAA
 40
 Lys Glu Ala Glu Sis Lys Phe Lys Glu Ile Glu Glu Ala Tyr Glu
 AAA CAA GCT GAG GCC AAA TTT AAA GAA ATC CAG GAA GCC TAC GAA
 50
 Ile Leu Ser Asp Glu Thr Lys Arg Lys Glu Tyr Asp Lys Phe Glu
 ATT TTA TCT GAT GAA ACA AAG CGA AAA CAG TAC GAT AAA TTC GGT
 60
 70
 Ile Leu Ser Asp Glu Thr Lys Arg Lys Glu Tyr Asp Lys Phe Glu
 ATT TTA TCT GAT GAA ACA AAG CGA AAA CAG TAC GAT AAA TTC GGT
 80
 90
 His Ala Ala Phe Asp Glu Glu Glu Phe Gly Gly Ser Ser Gly Phe
 CAT GCC GCT TTT GAT CAG CAA TTT GGT GGT GGG TCT AGT GGC TTT
 100
 Ser Gly Phe Asp Phe Phe Gly Asp Ile Phe Ser Ser Phe Cys Ser Gly
 TCA GGA TTT GAT TTT GGC GAT ATT TTT TCA AGT TTT ACC TCT GGT
 110
 120
 Phe Gly Phe Gly Gly Ser Glu Glu Glu Lys Tyr Ser Arg Pro Leu
 ATT GGT TTT GGC GGC TCA CAA GAA CAA AAA TAT AGT CGT CCT TTA
 130
 Lys Gly Glu Asn Phe Glu Ala Lys Ile Tyr Ile Ser Phe Ile Glu
 AAC GGC GAA AAT TTT CAA GCT AAA ATT TAT ATC AGT TTT ATC GAG
 140
 150
 Ser Ile Leu Gly Lys Glu Ile Ser Glu Lys Ile Thr Lys Tyr Asp
 TCA ATT CTT GGA AAA GAA ATC TCC CAG AAA TAA ACA AAA TAC GAT

三一



持閱平2-291271 (38)

第32圖 - 1

481 CACCAACCTTATGTCGGAATTAACTTAAATAAACGAAATTA
 GTCAGTTAGAAAACGGGCTAAATTAAGGCGATTTTATGGCTTTAAT
 541 AAGGAGGAGGluAspLeuSerThrLys18ThrAspHeAlaAspDlys19Ser
 AACCAACATTGAAATTTCAACAAATTAACAAATTTGAGAAGAACGAGE
 TTAGCTTTAACCTTAAATAACTTAAATGTTAAAGCTTAAACGACTTTTGTCG
 596 Thr1112.

SerGlnAspProSerThrLeuArgAlaLeuPheGlnAlaAspLeuAsnThrAla
601 ACCAAARAAGCCATCACTCTACAGCTATGATTCAAACGGTTTAATACAGG
TCGGTTTCTAGGATCTGGATAACTAAAGCTTACGTTAATGCTAAATGCGC
609 XHUII, 648 ORAI.

ArgAsnProGluAspLeuAspLysLeuValAlaAsnLysPheProValLeuLysSerAla
66661 CGAAATCTGAGGTATGAGCTTACGCTTATTTCTGACTAAATTTCTGAGCTTAAATTT
GCCTTGGACTCCTAACCTATCTGAAAGCTTAATAAGGCTGAATAAAGGCTGAGATTTAAAT

172 5571, 778 ORAI,
TATGTCGTTATAGGACTTATAGGATTATATCCATTAAK
ATAACAGACTTAATATCTCTGAGAAATAATACCAATAATTAGGAAATT
TATGTCGTTATAGGACTTATAGGATTATATCCATTAAK

Proser Pheteulysalasoleuslerg1aserlaaglulevalasole
 CCTCGCINITTITAGAGCAGCTTAGICATAGTGCCGGAGAATTGATGAGCCA
 GERA5CAGAAATTGCGAGAACAGTTCAEGGGACCTTAATCTGATTCGCTT
 81

AspGluNglnProValAsnIleuArgLeuHlyLysAspAsnSerSerYr
GAAGCTCAGGATTAACATTAGAACTTAAAGAAGAGATACTCTCTA
CTATTCAGGGCATATGCTAAATCTATCTTCTTAACTAGAGATA

Leukin Giwaspphevasasagleuthyleusasonegolysgluasp
-TICIAATTGAGGATTGTTAACTGAARATGAAKAGAT
AAGGATTAAACCCAAACATIAAACATGACTTIAACCTTTCCTCA

Lewin et al. 1995 Arg Ser Lys Ser Ser Cysteine OP Lie Ser Ser Arg Y Fc lie Arg
TAATGCCAAAGGCAAAATTCCTGGCTTGTATTGATTCAGAATTAACCCGC
ATTTATCGTTCCAGTTAGAGACGCTACTTAAGAGCTATAATLGGC

Leprosy- τ rärgnGla legInserGvlySergGvleeservv Leprosy

reecke EKUlysAspSerArgValYVAlnIroGlyGluValPheGluGly
 ValAlaGlyGAAAGGTTCTGGGTGTTGGGGAGAAGCCGATTGGAGG
 AGCTTCTACCTTCTTAAGGCCAACAGAACTTCGCTCTAGGGCTAACTTCA
 GlyValPheArgValIleGluGlyLysTrpGlyIleGluGlyValDOP_Asp
 GGGGTTTGCGCAATGAGGCTCAGAAAGATAAGGAACTGAGGCCTGAGAT
 GCGCTTAAAGCCTGTTACTCCAGGTTCTTACGCTTCTGGCTTACGACTTAA

173 ASP'00, 143 bbyz, 168 AFLJ RL 07,
See *Proteins* *Glutathione* *Cysteine* *Glutamate*

Arg-Gly-Asp-Ser-Lys-Cys-Pro-Phe-Tyr-Lys-Phe-Asn-Asn-Sph-DL

319 DISP700.

Arg Val Leu Gly Leu Leu Lys Arg Ile Pro Lys Glu Leu His

Phenylalanine-rich heparinopeptide Cysteine-rich heparinopeptide
Glycine-rich heparinopeptide

TTTAAACCGTGATAAGGACCCTGATTTCACACTGGAACTTGTGATGTTACAGTGTACGG

- 548 -

特開平2-291271 (39)

四面の浮城

第32回 - 3

三六四

Restriction Map in DNA 96.Skgencomp (length = 3087) from the /uss2/arpl/lib/Snoise file. Translation shown at frame 1. Sequence is LINEAR

ATGAGTAAAGAACAAACATTAAATTTTGTGACGCCGATATGGCTTGCGCTTACACCCGAACT
TACATTTTGTGAAATTAACTTAAACAAACTGACGGCTTACACCCGAACT
22 DRA1.

- 550 -

228 - 5

圖面の説明

2461 LEAD(IV)MISOPROPYLATE OF CEFASPIRIN
2462 D672, 2460 DRA1.

270 | PART II: THE PRACTICE OF LEADERSHIP

Sepp Thury heeft een grote voorkeur voor de historische architectuur.

OF OC GLYCEROLIC ACID. THE THERAPEUTIC ACTION OF GLYCEROLIC ACID.

2941 CAAAGCTGACATGTTTGTATTCAGACATGAGCTTACAGATTAACAGATGAGCTA

PROALGlycineGinkgo
H. S. T. P.

061
 LELLAUGCAAGCTTACGCTTGACATGG
 GAACTGGCTGAGTCGGAACCTGTGAA
 1062 PESTL 1068 NSPHI SPRI. 2074 : 106111.

特開平2-291271 (41)

第34回 - 2

1

Leyginae Sodigam Asinlycosphelesis Anisognathus Progin

特開平2-291271 (42)

画面の操作

卷三

16.OCT.2000 16:32

PHILLIPS ORMONDE 96141867

NO. 0941 P. 44/44

特開平2-291271 (43)

第1頁の続き

優先権主張

②1989年4月7日③米国(US)④334,586

②1989年4月21日③米国(US)④341,968

②発明者

エミリー ブルツクス アメリカ合衆国、カリフォルニア州、ビノール、ライシン
グ グレン 1115番地

②発明者

キャロル コリー アメリカ合衆国、カリフォルニア州、バロ アルト、フォ
レスト アベニュー 661番地

手続用紙正二面

平成2年 6月27日

特許庁長官 吉田文義 駕

1. 事件の表示 平成1年特許願第165503号

2. 発明の名称 発現伝播体を有する組成物

3. 納正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 エム エル アクノロジー ベンチャーズ
エルピー

4. 代理人

住 所 東京都港区新橋3丁目3番14号
田村町ビルディング

電話 (503) 2621 (代)

氏 名 (6606) 代理士 丹羽宏之



5. 納正命令の日付 平成2年6月26日 (宛送日)

6. 納正の対象 図面

7. 納正の内容 別紙のとおり

適正な用紙を用いて十分に緻厚な墨
色で鮮明に描いたもの(第6, 12
~15, 17, 21, 22, 及び第
32~34図)

